

UCH-FC  
DOC-B  
6453  
C.1

**REGULACION DE LA LIBERACION DE CALCIO EN  
VESICULAS DE RETICULO SARCOPLASMATICO DE MUSCULO  
ESQUELETICO DE CONEJO.  
PARTICIPACION DE  $Mg^{2+}$ , ESTADO REDOX  
Y CALSECUESTRINA**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias  
por

**MARIANELA DEL CARMEN BELTRAN APABLAZA**



Abril, 2002

Directora de Tesis: Dra. Cecilia Hidalgo Tapia

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

**MARIANELA DEL CARMEN BELTRAN APABLAZA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 31, de ENERO del año 2002.

Directora de Tesis:

Dra. Cecilia Hidalgo T.

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Octavio Monasterio

Dra. Cecilia Vergara

Dra. Gloria Riquelme

Dr. Juan Bacigalupo

A mi abuelita, quien me dio tanto amor.

¡ Cómo agradecerle !

Todo el camino que con este trabajo recorrí te lo dedico a ti,  
querida abuelita.

Gracias mi Dios por este camino, por tu llamado y porque sé que sin ti nada habría podido hacer. Gracias Señor por todas las personas que tú pusiste en este peregrinar y por lo que cada una de ellas me entregó.

Agradezco sinceramente a mi directora de tesis, la Dra. Cecilia Hidalgo, quien siempre estuvo presente para guiar oportunamente mi trabajo. Agradezco la confianza que depositó en mí, su comprensión y excelente disposición. También le doy gracias por lo que me enseñó a través de su exigencia y esmero en hacer siempre bien las cosas.

Gracias a Paulina y a Ricardo por su presencia y apoyo cada vez que los necesité.

Gracias a mis excelentes compañeros de laboratorio y amigos, quienes fueron fundamentales tanto en el desarrollo de esta tesis como en amenizar las diversas jornadas. Especialmente a Genaro, Claudio, Carolina O., Soledad, Fernando y Titina.

Gracias a mis padres por esta vida que me dieron. Por enseñarme el sentido de la responsabilidad y de la entrega.

Gracias a mi amado esposo, a Matías y a la guagüita nueva, quienes son el más bello regalo que he recibido. Gracias Marcelo por todo el amor y el infinito apoyo que me das.

## INDICE

|   | Página |
|---|--------|
| - RESUMEN . . . . .   | I      |
| - SUMMARY . . . . .   | IV     |
| <br>  |        |
| - INTRODUCCION . . . . .  | 1      |
| - Excitación-contracción-relajación muscular . . . . .                                  | 1      |
| - El canal de liberación de Ca <sup>2+</sup> /Receptor de ryanodina . . . . .           | 3      |
| - Modulación del canal receptor de ryanodina de músculo<br>esquelético (RyR1) . . . . . | 5      |
| - Receptor de dihidropiridinas . . . . .  | 5      |
| - Calsecuestrina . . . . .  | 6      |
| - Triadina y juntina . . . . .  | 10     |
| - Otras proteínas . . . . .   | 10     |
| - FKBP-12 . . . . .   | 11     |
| - Calmodulina . . . . .   | 12     |
| - Ca <sup>2+</sup> . . . . .  | 12     |
| - Mg <sup>2+</sup> . . . . .  | 14     |
| - ATP <sup>2-</sup> . . . . .   | 15     |
| - Cafeína . . . . .   | 16     |
| - Oxido-reducción . . . . .   | 17     |
| - Hipótesis . . . . .   | 19     |
| - Objetivos Específicos . . . . .   | 19     |
| <br>  |        |
| - MATERIALES Y METODOS . . . . .  | 21     |
| - Aislamiento de vesículas de retículo sarcoplasmático de<br>conejo . . . . .           | 21     |

|  |    |
|--|----|
| - Extracción de calsecuestrina de las vesículas aisladas de RS . . .   | 22 |
| - Permeabilización de las vesículas de RS . . . . .  | 22 |
| - Aislamiento de membranas de la zona de unión (JFM) del RS<br>terminal . . . . .  | 23 |
| - Extracción de calsecuestrina de las JFM . . . . .  | 24 |
| - Diálisis de las membranas de la zona de unión (JFM) . . . . .  | 24 |
| - Purificación de calsecuestrina . . . . .   | 24 |
| - Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS . . .  | 25 |
| - Experimentos de captación y liberación de calcio . . . . .   | 26 |
| - Determinación de las constantes de velocidad inicial de la<br>liberación de calcio inducida por cafeína . . . . .        | 27 |
| - Incubación de las vesículas de RS con reactivos redox . . . . .  | 29 |
| - Determinación de la acumulación de calcio vesicular . . . . .  | 29 |
| - Carga pasiva de calcio al equilibrio . . . . .   | 29 |
| - Mediciones de $[Ca^{2+}]$ libre . . . . .  | 30 |
| - Mediciones de fluorescencia intrínseca . . . . .   | 31 |
| - Mediciones cinéticas de la disociación del calcio unido a<br>calsecuestrina en solución o asociada a membranas . . . . . | 32 |
| - Materiales . . . . .   | 32 |
| <br>   |    |
| - RESULTADOS . . . . .   | 34 |
| I. LIBERACION DE CALCIO DESDE VESICULAS DE RETICULO<br>SARCOPLASMATICO DE MUSCULO ESQUELETICO DE<br>CONEJO . . . . .       | 34 |
| I. 1. Cafeína produce una liberación transitoria de calcio<br>seguida por oscilaciones . . . . .                           | 34 |
| I. 2. Efecto de $[Mg^{2+}]$ libre y $[Mg-ATP]$ en la liberación de<br>calcio inducida por cafeína . . . . .                | 36 |

|  |    |
|--|----|
| I. 3. AMP-PNP produce una liberación de calcio transitoria<br>con un patrón oscilatorio poco frecuente . . . . .                                       | 38 |
| I. 4. Oscilaciones espontáneas de liberación de calcio . . . . .   | 39 |
| I. 5. El aumento del contenido de calcio luminal no anula el<br>comportamiento oscilatorio de las vesículas . . . . .                                  | 40 |
| I. 6. Efecto de la concentración de cafeína en la liberación de<br>calcio . . . . .  | 41 |
| I. 7. Cinética de la liberación de calcio inducida por cafeína . . . .   | 42 |
| I. 8. La oxidación y reducción de las vesículas modifica el tiempo<br>de liberación y el comportamiento oscilatorio inducidos por<br>cafeína . . . . . | 44 |
| <br>   |    |
| II. LIBERACION DE CALCIO DESDE VESICULAS DE RETICULO<br>SARCOPLASMATICO SIN CALSECUESTRINA . . . . .   | 47 |
| II. 1. Obtención de vesículas de RS de conejo sin calsecuestrina . .   | 47 |
| II. 2. Captación y liberación de calcio en vesículas de RS sin<br>calsecuestrina . . . . .   | 48 |
| II. 3. Las vesículas sin calsecuestrina tienen una cinética de<br>liberación inicial de calcio más lenta y de duración más<br>corta . . . . .          | 50 |
| <br>   |    |
| III. DISOCIACION DEL CALCIO UNIDO A CALSECUESTRINA . . . . .   | 51 |
| III. 1. Permeabilización de vesículas de RS . . . . .  | 52 |
| III. 2. Cambios de fluorescencia asociados a la unión de calcio<br>a calsecuestrina . . . . .  | 53 |
| III. 3. Preparación de membranas de la zona de unión del RS<br>(JFM) . . . . .   | 55 |
| III. 4. Cinética de la disociación del calcio unido a<br>calsecuestrina . . . . .  | 57 |

|   |           |
|---|-----------|
| III. 4. a. Calsecuestrina en solución . . . . .                                   | 57        |
| III. 4. b. Calsecuestrina asociada a las JFM . . . . .                            | 58        |
| <b>III. 5. Cinética de los cambios en la fluorescencia intrínseca de</b>          |           |
| <b>    calsecuestrina . . . . .</b>   | <b>58</b> |
| III. 5. a. Calsecuestrina en solución . . . . .                                   | 59        |
| III. 5. b. Calsecuestrina asociada a las JFM . . . . .                            | 59        |
| <b>- DISCUSION . . . . .</b>  | <b>61</b> |
| <b>- Oscilaciones de liberación de calcio en vesículas enriquecidas</b>           |           |
| <b>en triadas . . . . .</b>   | <b>61</b> |
| <b>- Efecto de Mg<sup>2+</sup> sobre la liberación transitoria de calcio y el</b> |           |
| <b>subsecuente comportamiento oscilatorio . . . . .</b>                           | <b>62</b> |
| <b>- Efecto de la oxidación y reducción de las vesículas . . . . .</b>            | <b>63</b> |
| <b>- Efecto de cafeína sobre la liberación de calcio . . . . .</b>                | <b>66</b> |
| <b>- Participación de calsecuestrina en el proceso de liberación</b>              |           |
| <b>de calcio . . . . .</b>  | <b>68</b> |
| <b>- Cambios de fluorescencia intrínseca asociados a la unión de</b>              |           |
| <b>calcio a calsecuestrina y cinética de la disociación del calcio</b>            |           |
| <b>unido . . . . .</b>  | <b>71</b> |
| <b>- Implicaciones fisiológicas . . . . .</b>                                     | <b>73</b> |
| <b>- CONCLUSIONES . . . . .</b>   | <b>78</b> |
| <b>- REFERENCIAS . . . . .</b>  | <b>80</b> |

## LISTA DE TABLAS

### **Tabla 1**

Composición de las soluciones.

### **Tabla 2**

Concentraciones de  $Mg^{2+}$ ,  $ATP^{2-}$  y Mg-ATP utilizadas en los experimentos de liberación de calcio.

### **Tabla 3**

Tiempo de liberación  $T_L$ , medido con diferentes concentraciones de Mg-ATP.

### **Tabla 4**

Ajuste de los datos de la Figura 12 a una función de Hill.

### **Tabla 5**

Comparación entre las constantes de velocidad de la disociación de calcio y los cambios de fluorescencia intrínseca.

## LISTA DE FIGURAS

### **Figura 1**

Determinación de la  $K_D$  para calcio del indicador fluorescente de calcio Calcium Green-2.

### **Figura 2**

Liberación de calcio inducida por cafeína desde vesículas de RS de conejo.

### **Figura 3**

Efecto de  $[Mg^{2+}]$  libre y  $[Mg-ATP]$  en la liberación de calcio inducida por cafeína.

### **Figura 4**

Efecto de  $[Mg^{2+}]$  libre y  $[Mg-ATP]$  sobre el tiempo de liberación de calcio ( $T_L$ ) inducido por cafeína.

### **Figura 5**

Liberación de calcio inducida por AMP-PNP en distintas  $[Mg^{2+}]$  libre.

### **Figura 6**

Liberaciones espontáneas de calcio con un patrón oscilatorio.

### **Figura 7**

Efecto del aumento del contenido de calcio luminal en la liberación de calcio inducida por cafeína.

### **Figura 8**

Efecto del aumento del contenido de calcio luminal en las oscilaciones de calcio inducidas por cafeína.

### **Figura 9**

Efecto del aumento de la concentración de cafeína en la liberación de calcio inducida por cafeína.

### **Figura 10**

Efecto de la concentración de cafeína sobre el tiempo de liberación de calcio ( $T_L$ ).

### **Figura 11**

Registros cinéticos de la liberación de calcio inducida por cafeína obtenidos desde un espectrofluorímetro de flujo detenido.

**Figura 12**

Efecto de  $[Mg^{2+}]$  libre sobre las constantes de velocidad de liberación de calcio inducida por concentraciones crecientes de cafeína.

**Figura 13**

Efecto de  $[Mg^{2+}]$  libre sobre el resultado de los ajustes a una función de Hill.

**Figura 14**

Efecto de glutatión reducido (GSH) en la liberación de calcio inducida por cafeína.

**Figura 15**

Efecto de agentes redox en la liberación de calcio inducida por cafeína en distintas  $[Mg^{2+}]$  libre.

**Figura 16**

Efecto de  $[Mg^{2+}]$  libre sobre el tiempo de liberación ( $T_L$ ) inducido por cafeína en distintos estados redox de las vesículas.

**Figura 17**

Efecto de la incubación de las vesículas con concentraciones crecientes de timerosal en la liberación de calcio inducida por cafeína.

**Figura 18**

Efecto de la incubación de las vesículas con concentraciones crecientes de GS-NO en la liberación de calcio inducida por cafeína.

**Figura 19**

Reversión del efecto de timerosal en la liberación de calcio inducida por cafeína, por incubación con GSH.

**Figura 20**

Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) de vesículas de retículo sarcoplasmático de conejo.

**Figura 21**

Liberación de calcio inducida por cafeína y ATP en vesículas de RS sin calsecuestrina.

**Figura 22**

Cinética de la liberación de calcio inducida por cafeína en vesículas sin calsecuestrina.

**Figura 23**

Patrón electroforético de proteínas de vesículas de RS de conejo permeabilizadas con Tritón X-100 Hidrogenado (Tritón-H).

**Figura 24**

Cambios en la fluorescencia intrínseca de calsecuestrina asociados con la unión de calcio.

**Figura 25**

Microfotografía electrónica de vesículas de RS terminal y membranas de la zona de unión (JFM).

**Figura 26**

Patrón electroforético de proteínas de las etapas de preparación de membranas de la zona de unión (JFM).

**Figura 27**

Patrón electroforético de proteínas de las etapas de preparación de membranas de la zona de unión (JFM).

**Figura 28**

Cinéticas de disociación del calcio unido a calsecuestrina en solución (panel A) o asociada a membranas (panel B).

**Figura 29**

Cinéticas del cambio de fluorescencia intrínseca de calsecuestrina por la disociación del calcio unido a calsecuestrina en solución (panel A) o asociada a membranas (panel B).

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                   |   |  |
|-------------------|---|--|
| AMP-PNP           | : | 5'-adenililimidodifosfato  |
| ATP               | : | Adenosina 5'-trifosfato, sal disódica  |
| ATP <sup>2-</sup> | : | H <sub>2</sub> ATP <sup>2-</sup>   |
| Mg-ATP            | : | Mg-H <sub>2</sub> ATP  |
| BAPTA             | : | Acido 1,2-bis(2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacético                    |
| EGTA              | : | Acido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético               |
| HEDTA             | : | Acido N-(2-hidroxietil)-etilendiamina-triacético                             |
| GSH               | : | Glutation en su forma reducida   |
| GS-NO             | : | Glutation nitrosilado  |
| JFM               | : | Membranas de la zona de unión (del inglés <i>junctional face membranes</i> ) |
| JFM-Cs            | : | Membranas de la zona de unión sin calsecuestrina                             |
| Mops              | : | Acido 3-[N-morfolino]-propanosulfónico                                       |
| SDS               | : | Dodecil sulfato de sodio   |
| SDS-PAGE          | : | Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS                  |
| Tris              | : | Tris-(hidroximetil)aminometano   |
| Tritón-H          | : | Tritón X-100 Hidrogenado   |

## RESUMEN

El canal de calcio/receptor de ryanodina permite que el calcio contenido en el retículo sarcoplasmático (RS) sea liberado hacia el mioplasma. Múltiples componentes celulares regulan la actividad de este canal de calcio, entre los que se distinguen:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{ATP}^{2-}$ , calcio luminal, agentes que reaccionan con grupos SH, entre otros. Por otra parte, existen evidencias que sugieren que calsecuestrina, una proteína del lumen del RS, estaría regulando la cinética de liberación de calcio. Originalmente, a esta proteína se le atribuyó un papel de tampón de calcio, lo que permite acumular grandes cantidades de este ion al interior del RS. Es importante establecer la cinética de disociación del calcio desde la calsecuestrina para investigar si es una etapa limitante de la liberación de calcio.

En esta tesis se caracterizó la participación de  $\text{Mg}^{2+}$ , de calsecuestrina y del estado redox de proteínas, en la cinética de liberación de calcio inducida por cafeína. Se utilizó una preparación de vesículas aisladas de RS de músculo esquelético de conejo y se midió la liberación de calcio siguiendo la señal de indicadores fluorescentes de calcio. Cafeína indujo liberación transitoria y parcial de calcio en el intervalo de  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre 0,05 - 2,5 mM. En vesículas nativas, en  $[\text{Mg}^{2+}]$  0,1 - 0,5 mM este primer evento de liberación fue seguido por oscilaciones de calcio. En ausencia de cafeína se observaron oscilaciones espontáneas de calcio. La magnitud y la duración del primer evento de liberación inducido por cafeína disminuyeron con el aumento de  $[\text{Mg}^{2+}]$ . Al oxidar las vesículas, aumentó la duración del primer evento de liberación en todas las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  probadas. Lo inverso ocurrió al reducir las vesículas. El patrón

oscilatorio también se modificó al tratar las vesículas con los reactivos redox. Se sabe que estos reactivos modifican la afinidad del sitio inhibitorio para  $Mg^{2+}$ . Estos resultados indican que las vesículas de RS poseen todos los elementos requeridos para la generación de oscilaciones de calcio, que previamente habían sido observadas sólo en células y en fibras musculares. Además, los resultados indican que la liberación de calcio inducida por cafeína está directamente regulada por  $[Mg^{2+}]$  libre y que al modificar el(los) sitio(s) inhibitorio(s) para  $Mg^{2+}$ , cambia marcadamente la respuesta a cafeína.

En vesículas sin calsecuestrina disminuyó la cantidad de calcio acumulada tanto en forma pasiva como en forma activa. El calcio acumulado fue liberable por agonistas del canal de ryanodina. La liberación de calcio presentó una constante de velocidad de liberación menor que en vesículas control. También se redujo la duración de la liberación neta de calcio. No se observaron oscilaciones de calcio en vesículas sin calsecuestrina. Esta proteína fue fundamental no sólo para que las vesículas acumularan grandes cantidades de calcio sino que también para su posterior liberación con una cinética rápida acorde con las exigencias del músculo esquelético.

Estudios cinéticos de la disociación del calcio unido a calsecuestrina indican que la disociación del calcio desde calsecuestrina en solución o asociada a membranas fue más rápida que los cambios de fluorescencia intrínseca asociados. Se utilizó una preparación de membranas de la zona de unión del RS al túbulo transversal. Estas membranas son denominadas JFM, del inglés *junctional face membranes*. En las JFM, la disociación de calcio y el cambio de fluorescencia intrínseca fueron más rápidos que en calsecuestrina en solución. El  $t_{1/2}$  de la disociación de calcio en JFM fue de 6,5 mseg a

25 °C. Es probable que a 37 °C, la disociación de calcio sea aun más rápida. Estos resultados sugieren que la disociación de calcio desde calsecuestrina *in vivo* no es limitante de la velocidad de liberación de calcio desde el RS.

## SUMMARY

Calcium release towards myoplasm proceeds through the ryanodine receptor-calcium release channels located in the sarcoplasmic reticulum (SR). Multiple cellular components regulate the activity of this calcium channel. Among them are remarkable:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{ATP}^{2-}$ , luminal calcium and SH groups reacting agents. On other hand, there are evidences that suggest that calsequestrin, a protein localized in the luminal spaces of SR, may regulate calcium release kinetic. Calsequestrin acts as a calcium buffer too, allowing accumulate large quantities of calcium inside of SR. It is important study the calcium dissociation kinetic from calsequestrin to research if is a restrictive event of calcium release.

In this thesis, the participation of  $\text{Mg}^{2+}$ , redox state, calsequestrin, in the caffeine induced calcium release kinetic was characterized. A preparation of isolated vesicles from rabbit skeletal muscle SR was utilized and calcium release was measured with calcium fluorescent indicators. In free  $[\text{Mg}^{2+}]$  0.05 to 2.5 mM, caffeine induced transient and parcial calcium release. In native vesicles, in free  $[\text{Mg}^{2+}]$  0.1 to 0.5 mM, after the end of the first release event, calcium was released from vesicles in a oscillatory pattern. Calcium oscillations were observed without caffeine too. Magnitude and duration of first release event induced by caffeine were decreased with  $[\text{Mg}^{2+}]$  increased. In oxidized vesicles, the duration of first release event was increased in all  $[\text{Mg}^{2+}]$  tested. In reduced vesicles, the contrary effect was observed. The oscillatory pattern in vesicles handle with redox agents was modified too. It is known these agents modify the inhibitory site affinity for  $\text{Mg}^{2+}$ . These results indicate that SR vesicles have all necessary constituents

for generate calcium oscillations, that previously had been observed only in muscle cells and fibres. Furthermore, the results indicate that caffeine induced calcium release is directly regulated by free  $[Mg^{2+}]$  and that the modification of the inhibitory(ies) site(s) for  $Mg^{2+}$ , markedly change the response to caffeine.

In vesicles without calsequestrin decreased the quantity of accumulated calcium in passive and active way. The accumulated calcium was released by agonists. The release rate constant was lesser in vesicles without calsequestrin than in control vesicles. The duration of net calcium release was decreased too. Calcium oscillations were not observed in vesicles without calsequestrin. This protein was fundamental for both to accumulated large calcium quantities inside SR vesicles and to release it with a fast kinetic agreed with the skeletal muscle demands.

Kinetics studies of calcium dissociation of calcium bound to calsequestrin indicate that calcium dissociation from calsequestrin in solution or from membranes associated calsequestrin from SR junction face (JFM) was faster than intrinsic fluorescence changes associated. Calcium dissociation and intrinsic fluorescence changes were faster in JFM than in calsequestrin in solution. The half time of calcium dissociation in JFM was 6.5 ms to 25 °C. It is probably that to 37 °C, the calcium dissociation is even faster. These results suggest that calcium dissociation from calsequestrin *in vivo* is not rate limiting of calcium release from SR.

## INTRODUCCION

El ion calcio participa en numerosos eventos celulares que ocurren en distintas etapas de la vida, desde la fertilización hasta la muerte celular (Stricker y cols, 1992; Whitaker y Patel, 1990, Berridge y cols, 1998). Entre los procesos que controla este segundo mensajero se incluyen el desarrollo, la diferenciación y el metabolismo celular, la contractilidad y la relajación muscular, la secreción vesicular y hormonal, y la transmisión sináptica (Berridge, 1993; Clapham, 1995). Para ejercer sus variadas funciones, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  debe estar estrictamente compartimentalizado y sus niveles intra y extracelulares deben ser finamente regulados.

En el músculo esquelético, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mioplasmática en reposo es  $\sim 10^{-7}$  M. Cuando este nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta hasta  $\sim 10^{-6}$ – $10^{-5}$  M se produce la contracción muscular (revisado por Berchtold y cols., 2000). Estos cambios bifásicos transitorios de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmática son producto de una rápida liberación inicial de  $\text{Ca}^{2+}$  (fase de la contracción) y una subsecuente rápida captación del ion al interior del retículo sarcoplasmático (RS) (Ríos y Pizarro, 1991).

### **Excitación-contracción-relajación muscular**

En el músculo esquelético la contracción se inicia por un potencial de acción que se origina en la unión neuromuscular y que se propaga desde la membrana plasmática al interior de la fibra muscular por los túbulos transversales (T-T). La transducción de esta señal de despolarización de los T-T a una respuesta de calcio intracelular es mediada por

el sensor de voltaje/receptor de dihidropiridinas de los T-T que activa el canal de liberación de calcio/receptor de ryanodina (RyR) del RS, por un mecanismo aun no bien entendido (Meissner, 1994; Melzer y cols., 1995; Leong y MacLennan, 1998a). En todo momento, la liberación de calcio desde el retículo está bajo un estrecho control por los sensores de voltaje y se detiene rápidamente si estos sensores dejan de ser activados (Suda, 1995; Lamb, 2000). Cuando los canales de liberación de calcio del RS se cierran (Meissner y cols., 1986; Lamb y Stephenson, 1991), el calcio es acumulado en el retículo por medio de la bomba de calcio reticular, la Ca-ATPasa, y el músculo se relaja al retornar el calcio a sus niveles de reposo.

La señal de despolarización es transmitida desde el sistema tubular al RS en uniones especializadas denominadas triadas (Mitchell y cols., 1983). Estas uniones consisten principalmente de dos estructuras proteicas fundamentales, una tétrada formada por cuatro complejos de receptores de dihidropiridinas, localizada en el sistema tubular, y un homotetrámero en la membrana del RS que corresponde al canal de liberación de calcio/RyR (Franzini-Armstrong y Nunzi, 1983; Block y cols., 1988; Franzini-Armstrong y Jorgensen, 1994). Se ha propuesto que existe un contacto directo entre ambas estructuras (Fleischer e Inui, 1989; Ríos y cols., 1991) lo que permitiría que un cambio conformacional del receptor de dihidropiridinas sea transmitido directamente activando el canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ /RyR. De todos los RyR presentes en la unión triádica, solamente un homotetrámero por medio está acoplado con una tétrada de receptor de dihidropiridina (Franzini-Armstrong y Kish, 1995). Se ha propuesto que en los RyR desacoplados, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre luego que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por los RyR acoplados activa estos receptores provocando liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$

(Ríos y Stern, 1997). Recientemente, se ha propuesto un tercer mecanismo denominado *gating* acoplado que consiste en que grupos de RyR que están en contacto físico se activan de una manera coordinada (Marx y cols., 1998). La consecuencia de esta hipótesis es que los grupos de RyR operan como unidades funcionales y generan eventos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  locales, rápidos y más grandes que si cada canal funcionara en forma independiente (Bers y Fill, 1998).

### **El canal de liberación de $\text{Ca}^{2+}$ /Receptor de ryanodina**

El canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  es una proteína integral de membrana del RS formada por cuatro subunidades homólogas de ~565 kDa cada una (Lai y cols., 1989). Este canal posee sitios de muy alta afinidad para el alcaloide vegetal ryanodina, lo que ha determinado que se denominen indistintamente canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  o receptores de ryanodina. Esta unión de gran afinidad ha sido útil para localizar, purificar e identificar el canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (Fleischer y cols., 1985; Pessah y cols., 1986a; Pessah y cols., 1986b; Inui y cols., 1987; Lai y cols., 1988). La unión de [ $^3\text{H}$ ]ryanodina al RyR depende del estado funcional de la proteína canal, lo que ha sido de gran utilidad para analizar los efectos de moduladores del canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zucchi y Ronca-Testoni, 1997). Se ha mostrado que ryanodina se une a la forma abierta o forma que conduce del canal RyR (Ogawa, 1994; Fleischer and Inui, 1989; McPherson and Campbell, 1993; Meissner y El-Hashem, 1992; Bianchi, 1997). En estudios de canal único incorporados en bicapas planas de fosfolípidos se ha demostrado que ryanodina tiene un efecto múltiple (Bull y cols, 1989; Rousseau y cols., 1987; Meissner, 1986b; Buck y cols., 1992). Concentraciones de ryanodina 5 a 40 nM activaron el canal, con

ryanodina > 50 nM se indujo la aparición de un estado de subconductancia ( $\sim \frac{1}{2}$  de la conductancia basal) con una probabilidad de apertura cercana a 1, con ryanodina > 70  $\mu$ M se generó la transición a un estado de conductancia menor ( $\sim \frac{1}{4}$  de la conductancia basal), y concentraciones micromolares del alcaloide (> 200  $\mu$ M) cerraron completamente el canal. Tanto los estados de subconductancia en los que el canal permanece abierto como el estado de bloqueo inducidos por ryanodina, no fueron reversibles en la escala temporal de los registros.

Se han identificado, clonado y secuenciado tres isoformas del RyR: RyR1, RyR2 y RyR3 (Takeshima y cols., 1989; Zorzato y cols., 1990; Otsu y cols., 1990; Nakai y cols., 1990; Hakamata y cols., 1992). La isoforma RyR1 se expresa principalmente en el músculo esquelético y en algunas regiones del cerebro, predominantemente en células de Purkinje del cerebelo y también se ha detectado en el músculo liso. La isoforma RyR2 es la forma predominante del músculo cardíaco y también la forma más expresada en el cerebro. También se ha encontrado algún nivel de expresión de RyR2 en el músculo liso. En el cerebro se distribuyen las tres isoformas, de las cuales el RyR3 es el componente menor. RyR3 está presente en el músculo esquelético embrionario y es particularmente abundante en algunas especies. Además, el diafragma y músculo liso de mamífero expresan RyR3 pero en cantidades menores (Takeshima y cols., 1989; Furuichi y cols., 1994; Giannini y cols., 1995; Kuwajima y cols., 1992; Ledbetter y cols., 1994; Neylon y cols., 1995; Nakai y cols., 1990; Otsu y cols., 1990; Lai y cols., 1992a; Coronado y cols., 1994; Meissner, 1994; Sutko y Airey, 1996; Zucchi y Rosca-Testoni, 1997; Franzini-Armstrong y Protassi, 1997). En músculo de vertebrados no mamíferos, aves, anfibios, reptiles y peces, se han encontrado dos isoformas de RyR, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$

(Airey y cols., 1990; Lai y cols., 1992b; Murayama y Ogawa, 1992; O'Brien y cols., 1993; Olivares y cols., 1991). Aproximaciones moleculares han mostrado que la isoforma  $\beta$  de pollo y rana correspondería a RyR3, mientras que la isoforma  $\alpha$  es homóloga a RyR1 (Conti y cols., 1996; Giannini y cols., 1995; Oyamada y cols., 1994; Ottini y cols., 1996).

### **Modulación del canal receptor de ryanodina de músculo esquelético (RyR1)**

Múltiples componentes celulares y reacciones metabólicas regulan la actividad del canal RyR. Entre estos se distinguen  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{H}^+$ ; derivados de adenina como  $\text{ATP}^{2-}$  y ADP-ribosa cíclica; proteínas presentes en la triada como calsecuestrina, triadina, juntina, FKBP-12, calmodulina; el receptor de dihidropiridinas y reacciones metabólicas como fosforilación y oxidación (Meissner, 1994; Coronado y cols., 1994; Franzini-Armstrong y Protassi, 1997; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997, Lamb 2000).

Receptor de dihidropiridinas: El complejo receptor de dihidropiridinas está compuesto por cinco subunidades:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . La subunidad  $\alpha_1$  posee los sitios de unión para dihidropiridinas y representa la vía de conducción para calcio. Posee cuatro regiones que se repiten (I a IV) con seis putativos segmentos de transmembrana cada una (revisado en Melzer y cols., 1995). Existen a lo menos dos isoformas del receptor, una esquelética (Tanabe y cols., 1987) y otra cardíaca (Mikami y cols., 1989). Estudios con quimeras de cDNA esquelético y cardíaco (Tanabe y cols., 1990) sugieren que el asa II-III de la subunidad  $\alpha_1$  del receptor de dihidropiridinas es un determinante clave para el tipo de acoplamiento excitación-contracción (esquelético o cardíaco), sobre la base de

que el acoplamiento tipo esquelético no necesitaría de calcio extracelular, en cambio el acoplamiento tipo cardíaco sí lo requiere.

El receptor de dihidropiridinas que se expresa en el músculo esquelético es una isoforma de canal de calcio tipo L, pero en este músculo no funciona como tal. Cuando estos receptores son activados por despolarización, sólo se produce una pequeña y muy lenta entrada de calcio extracelular hacia el citoplasma que no es suficiente para activar los canales de liberación de calcio del RS adyacente (Lamb, 2000). En cambio, se ha mostrado que los receptores de dihidropiridinas del músculo esquelético actúan como sensores de voltaje que experimentan cambios conformacionales inducidos por despolarización que se transmiten a los RyR (Schneider y Chandler, 1973; Ríos y cols., 1992; Lamb, 2000) que interactúan con los sensores de voltaje (Block y cols., 1988; Nakai y cols., 1998a) mediante contacto directo del lazo II-III de la subunidad  $\alpha_1$  del receptor de dihidropiridinas con el RyR (Tanabe y cols., 1990; Lu y cols., 1994; El-Hayek y cols., 1995; Slavik y cols., 1997; El-Hayek e Ikemoto, 1998; Leong y MacLennan, 1998b; Nakai y cols., 1998b; Dulhunty y cols., 1999; Gurrola y cols., 1999; Saiki y cols., 1999; Stange y cols., 2001). Esta interacción provoca liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS y se denomina liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por despolarización.

Calsequestrina: La calsequestrina es la principal proteína del lumen de las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático (Franzini-Armstrong y cols., 1987). Se ha deducido su secuencia primaria a partir del DNA complementario de calsequestrina de músculo esquelético rápido de conejo (Fliegel y cols., 1987). Posee cinco residuos triptófanos que se localizan en el tercio carboxilo terminal de la molécula, no posee

residuos cisteína y es relativamente rica en residuos de prolina en la mitad de su extremo carboxilo terminal. Este componente luminal tiene un alto contenido de aminoácidos ácidos. La mayoría de estos residuos cargados negativamente se agrupan en la región carboxilo terminal de la proteína y posiblemente representan los dominios de unión de calcio (Fliegel y cols., 1987; Ohnishi y Reithmeier, 1987; Yano y Zarain-Herzberg, 1994). La calsecuestrina tiene una gran capacidad de unión de calcio, 40-50 moles/mol de proteína, con una afinidad moderada de 1 mM (Ikemoto y cols., 1974; Damiani y cols., 1986; Volpe y Simon, 1991). Se ha demostrado que esta alta capacidad de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  es el resultado de la formación de agregados  $\text{Ca}^{2+}$ -calsecuestrina en concentraciones relativamente altas de calcio y de la proteína (Tanaka y cols., 1986). En tales condiciones, dos tercios del calcio total unido se asoció con los agregados  $\text{Ca}^{2+}$ -calsecuestrina, mientras que un tercio estuvo asociado con la forma no agregada de calsecuestrina. Además se ha encontrado que la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a calsecuestrina exhibe cooperatividad positiva, lo que ocurre concomitantemente con un desplazamiento en el equilibrio de la forma soluble a la forma cristalina (Aaron y cols., 1984; Tanaka y cols., 1986).

Wang y cols. (1998) cristalizaron la calsecuestrina y resolvieron su estructura tridimensional. La estructura monomérica tiene tres dominios que se pliegan en forma similar: 5 láminas  $\beta$  en el núcleo rodeadas de 4  $\alpha$ -hélices. Los 5 residuos triptófanos que posee la calsecuestrina, se localizan en el dominio III de la estructura cristalizada.

Varios investigadores han mostrado que los cambios conformacionales inducidos por  $\text{Ca}^{2+}$  están asociados con: a) un aumento del contenido de  $\alpha$ -hélice, lo que fue medido por discoisismo circular (Ikemoto y cols., 1972, 1974; Ostwald y MacLennan,

1974b; Aaron y cols., 1984); b) una internalización de grupos triptófanos, lo que se evidenció por un aumento en la intensidad de fluorescencia intrínseca (Ikemoto y cols., 1974; Mitchell y cols., 1988); c) un aumento en la compactación, que fue deducido por la mayor resistencia a la digestión por tripsina (Mitchell y cols., 1988; Ohnishi y Reithmeier, 1987); d) un plegamiento completo de la proteína estabilizándose no sólo el contenido de  $\alpha$ -hélice sino también otras estructuras secundarias, evidenciado por espectroscopía  $^1\text{H NMR}$  (Aaron y cols., 1984); y e) una disminución del radio de Stokes (Cozens y Reithmeier, 1984). Además, el cambio conformacional de calsecuestrina al unir  $\text{Ca}^{2+}$  fue evidenciado por estudios de la interacción de calsecuestrina con fenil Sefarosa, lo que mostró que calsecuestrina se une a esta resina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando un dominio hidrofóbico está expuesto, y se eluye de la resina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando el dominio hidrofóbico está internalizado (Cala y Jones, 1983; Mitchell y cols., 1988). De estos antecedentes, la calsecuestrina al unir  $\text{Ca}^{2+}$  se torna a una estructura con mayor contenido de hélice y cadenas laterales hidrofóbicas escondidas, mientras se pliega en una estructura más compacta que es resistente a la digestión con tripsina.

Calsecuestrina está concentrada en la cisterna terminal del RS (Meissner, 1975; Lau y cols., 1977; Campbell y cols., 1980; Jorgensen y cols., 1979, 1983) donde forma una red muy compacta en el centro de la cisterna y se ancla a la membrana del RS preferentemente en la zona de unión donde se localizan los canales de calcio/RyR (Franzini-Armstrong y cols., 1987; Fleischer e Inui, 1989; Franzini-Armstrong y Jorgensen, 1994; Jones y cols., 1998). Por microscopía tridimensional se evidenció la presencia de conexiones específicas entre calsecuestrina y la membrana del RS, las que

se encuentran predominantemente en la zona de unión del RS (Franzini-Armstrong y cols., 1987). Estas conexiones corresponden a los filamentos de anclaje que serían los responsables de mantener a la calsecuestrina en proximidad a los canales de liberación.

Calsecuestrina representa el principal sitio de almacenaje de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS en fibras del músculo esquelético (Jorgensen y cols., 1983; Franzini-Armstrong y cols., 1987). Originalmente se propuso que estaría regulando la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  libre al interior del retículo, lo que permitiría una alta acumulación del ion por medio de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (Ikemoto y cols., 1972, 1974; MacLennan y Wong, 1971). Posteriormente, de acuerdo a algunas evidencias, se propuso que calsecuestrina participa activamente en la regulación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS (Ikemoto y cols., 1989, 1991; Gilchrist y cols., 1992). Se observó que los cambios conformacionales de calsecuestrina al unir  $\text{Ca}^{2+}$  son transmitidos al RyR induciendo cambios conformacionales en esta proteína canal, los que se revierten por disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  unido a calsecuestrina (Ikemoto y cols., 1989). También se ha demostrado que la velocidad de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por cafeína (Ikemoto y cols., 1989) o por  $\text{ATP}^{2-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Donoso y cols., 1995) es menor cuando el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intravesicular disminuye, y se ha propuesto que este efecto se debe a que disminuye el  $\text{Ca}^{2+}$  unido a calsecuestrina. Además, al activar el canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se produjo un aumento transitorio de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, y se propuso que el canal al ser activado transmitiría una señal a calsecuestrina provocando la disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  unido, un aumento transitorio del  $\text{Ca}^{2+}$  libre y la subsecuente liberación de éste (Ikemoto y cols., 1991). Por otro lado, se ha mostrado que calsecuestrina activa los canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  incorporados en bicapas de fosfolípidos sintéticos al ser agregada en

el lado luminal del canal (Kawasaki y Kasai, 1994). Posteriormente se observó que calsecuestrina desfosforilada activó el RyR, mientras que calsecuestrina fosforilada no tuvo efecto (Szegedi y cols., 1999). También se demostró que calsecuestrina interactúa con otras proteínas de la membrana de la cisterna terminal del RS, como triadina y juntina, en una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Damiani y Margreth, 1990; Guo y Campbell, 1995), y recientemente ha sido demostrada la formación de un complejo entre calsecuestrina y el RyR en músculo esquelético de conejo (Murray y Ohlendieck, 1998).

No existen antecedentes sobre la cinética de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  unido a la calsecuestrina, de manera que es importante definir si esta disociación es una etapa limitante en el proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS, que tiene un tiempo medio de liberación de ~14 ms, medido en vesículas aisladas de RS de conejo (Donoso y cols., 2000).

Triadina y juntina: Triadina y juntina son proteínas homólogas integrales de membrana que se localizan en la zona de unión del RS con el túbulo transversal y proyectan hacia el interior del retículo su región carboxilo terminal altamente cargada y básica (Jones y cols., 1995; Knudson y cols., 1993). Se ha demostrado que cada una de estas proteínas se une a calsecuestrina y al RyR (Guo y cols., 1996; Guo y Campbell, 1995; Zhang y cols., 1997). Se ha sugerido que triadina (Caswell y cols., 1991) y juntina (Jones y cols., 1995) son los componentes de los filamentos de anclaje que mantienen a calsecuestrina en estrecho contacto con los canales de liberación de calcio en la zona de unión del RS.

Se ha encontrado que triadina se une a calsecuestrina y al RyR en una manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Guo y Campbell, 1995). Se mostró también que triadina une la subunidad  $\alpha_1$  del receptor de dihidropiridinas al RyR (Brandt y cols., 1990; Kim y cols., 1990) y puede jugar un importante papel en el acoplamiento excitación-contracción, ya que se ha observado que un anticuerpo contra triadina inhibió la fase lenta de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS inducida por despolarización (Brandt y cols., 1992). Experimentos posteriores, con triadina y calsecuestrina purificada, indicaron que la actividad del RyR se inhibe por triadina y se potencia por calsecuestrina (Ohkura y cols., 1998). Es probable que estos efectos opuestos se deban a la interacción entre estas proteínas y, en virtud de los resultados, se propuso un mecanismo regulatorio dual del RyR por triadina y calsecuestrina en el RS del músculo esquelético (Ohkura y cols., 1998).

FKBP-12: La FKBP-12 es una proteína citosólica de 12 kDa miembro de una familia de proteínas que unen las drogas inmunosupresoras FK506 y rapamicina. En el músculo esquelético, FKBP-12 está estrechamente asociada al RyR1, en una razón molar de 4:1, sugiriendo que una molécula de FKBP-12 está asociada con cada monómero del RyR (Collins, 1991; Jarayaman y cols., 1992). Se ha mostrado que FKBP-12 se une directamente con el canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y estabiliza los estados abierto y cerrado del canal, previniendo estados de subconductancia que se observan ocasionalmente con RyR purificado (Smith y cols., 1988; Ma y cols., 1995; Liu y cols., 1989; Gaburjakova y cols., 2001). Además, FKBP-12 aumenta el umbral a la activación

por cafeína y produce eventos de apertura más largos después de la activación por cafeína (Timerman y cols., 1993).

Calmodulina: La Calmodulina (CaM) es una proteína citosólica ubicua de ~ 17 kDa que une  $\text{Ca}^{2+}$  y, entre sus diversas funciones, regula la actividad del canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. Varios estudios indican que el efecto de CaM sobre el RyR1 tiene una dependencia bifásica en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citoplasmática, con una estimulación de la actividad del canal por CaM en los niveles nanomolares de este ion y una inhibición en niveles micromolares (Meissner, 1986a; Fuentes y cols., 1994; Tripathy y cols., 1995, Ikemoto y cols., 1995, 1996; Chen y cols., 1997). Esta modulación involucra una interacción CaM-RyR directa, ya que no es dependiente de  $\text{ATP}^{2-}$  (esencial para la actividad proteína kinasa) y ocurre entre proteínas purificadas (Smith y cols., 1989).

$\text{Ca}^{2+}$ : El  $\text{Ca}^{2+}$  tiene una importancia fundamental en la regulación del RyR. Se cree que es uno de los activadores fisiológicos del canal y, como se ha mencionado anteriormente, se ha propuesto que activaría a los RyR1 que no están acoplados con un receptor de dihidropiridinas. También se ha mostrado que otros ligandos, como ryanodina, anestésicos volátiles, cafeína y nucleótidos de adenina, no pueden activar el canal en la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , o requieren  $\text{Ca}^{2+}$  para su efecto máximo (Zucchi y Ronca-Testoni, 1997; Beltrán y cols, 1996). La mayoría de estos ligandos ejerce su efecto modificando la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  del canal (Coronado y cols., 1994; Meissner, 1994;

Ogawa, 1994; Sutko y Airey, 1996; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997; Meissner y cols., 1997).

Estudios de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en vesículas de RS evidencian una relación en forma de campana entre la liberación de calcio y la concentración de calcio extravesicular. En concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pCa} \geq 9$ , prácticamente no hubo liberación; en  $\text{pCa} \sim 5$  alcanzó un efecto máximo; y en  $[\text{Ca}^{2+}]$  milimolar disminuyó la liberación (Kim y cols., 1983; Kirino y cols., 1983; Nagasaki y Kasai, 1983; Meissner, 1984; Meissner y cols., 1986; Sumbilla e Inesi, 1987; Moutin y Dupont, 1988; Calviello y Chiesi, 1989; Donoso e Hidalgo, 1993). Registros de canal único confirmaron los resultados de flujo. En  $[\text{Ca}^{2+}]$  nanomolar, la probabilidad de apertura del canal ( $P_o$ ) fue cercana a cero, la activación máxima se observó en concentraciones mayores a  $100 \mu\text{M}$ , disminuyendo en el orden milimolar (Smith y cols., 1986; Ma y cols., 1988; Fill y cols., 1990; 1991; Lee y cols., 1991, Bull y Marengo, 1993; Shomer y cols., 1993). Para explicar la respuesta bifásica a  $\text{Ca}^{2+}$ , se ha señalado que el RyR posee un sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad, el cual estimula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , y un sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  de baja afinidad, el cual inhibe la liberación.

Además existen estudios que indican que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  también es modulada por  $\text{Ca}^{2+}$  intraluminal. En RS de músculo esquelético de conejo, la constante de velocidad de liberación aumentó con el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]$  luminal ( $\text{CE}_{50} = 260 \mu\text{M}$ ), siguiendo una función hiperbólica (Ikemoto y cols., 1989; Nelson y Nelson, 1990), lo que similarmente se observó en rana, pero con una relación sigmoídea (Donoso y cols., 1995).

Por otro lado, mediciones en canal único en experimentos en bicapas de lípidos planas mostraron que aumentando  $[Ca^{2+}]$  luminal desde 0,1 a 250  $\mu M$  aumentó la actividad del canal en potenciales citosólicos negativos; mientras que el aumento de  $[Ca^{2+}]$  a 1 ó 1,5 y 10 mM en el lado luminal provocó una disminución de la actividad del canal en potenciales citosólicos negativos y aumentó la actividad en potenciales positivos. Estos resultados sugieren que el flujo de calcio a través de los RyR regula la actividad del canal permitiendo que el  $Ca^{2+}$  tenga acceso a los sitios de activación y de inhibición localizados en el dominio citosólico del canal (Herrmann-Frank y Lehmann-Horn, 1996; Tripathy y Meissner, 1996).

Mg<sup>2+</sup>: En el músculo esquelético, la concentración citoplasmática de Mg<sup>2+</sup> libre se estima en 0,8-1 mM (Westerblad y Allen, 1992; Konishi y cols., 1993). En esta concentración, este ion inhibe la actividad del RyR (Lamb y Stephenson, 1991; Laver y cols., 1997) y se requiere para mantener los canales de liberación cerrados en reposo (Lamb, 2000). Mg<sup>2+</sup> disminuye la actividad del RyR con una reducción de la sensibilidad a Ca<sup>2+</sup> para la activación (Endo 1977). La inhibición por Mg<sup>2+</sup> depende de la concentración de Ca<sup>2+</sup>; se distingue un efecto dual de Mg<sup>2+</sup> en los dos sitios de Ca<sup>2+</sup>, actuando como un antagonista competitivo de Ca<sup>2+</sup> en el sitio de activación y como un agonista en el sitio de inhibición (Laver y cols., 1997; Meissner y cols., 1997). La afinidad del sitio de activación para Mg<sup>2+</sup> es aproximadamente 40-1000 veces más baja que para Ca<sup>2+</sup> y la unión de Mg<sup>2+</sup> no activa el canal (Meissner y cols., 1986; Laver y cols., 1997), de modo que la presencia de Mg<sup>2+</sup> 0,8-1 mM desplaza la dependencia de activación por Ca<sup>2+</sup> a  $[Ca^{2+}]$  más altas. La afinidad al sitio inhibitorio para Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>

es similar y la unión de  $Mg^{2+}$  a este sitio es tan efectiva en inducir inhibición como lo es la unión de  $Ca^{2+}$  (Meissner y cols., 1986; Laver y cols., 1997). Una tercera posibilidad de inhibición por  $Mg^{2+}$  es la unión de este ion a otro sitio del canal de liberación de calcio que podría bloquear la conducción del canal (Smith y cols., 1986).

ATP<sup>2-</sup>: ATP<sup>2-</sup> milimolar en su forma libre estimula la liberación de  $Ca^{2+}$  y abre los canales RyR en todos los tejidos de vertebrados en los que se ha estudiado su efecto (Meissner, 1984; Smith y cols., 1986; Suárez-Isla y cols., 1988; Moutin y Dupont, 1988; Donoso e Hidalgo, 1993). En el músculo esquelético, ATP<sup>2-</sup> tiene un fuerte efecto estimulante sobre el RyR. Cuando  $Mg^{2+}$  no está presente en el sitio inhibitorio, la unión de ATP<sup>2-</sup> a un sitio de baja afinidad ( $K_a \sim 1$  mM) estimula la apertura del canal aun en la ausencia de  $Ca^{2+}$  activante (Meissner y cols., 1986; Lamb y Stephenson, 1991; Lamb, 2000). En una fibra en reposo, el RyR permanece cerrado sólo debido al potente efecto inhibitorio que ocurre cuando  $Mg^{2+}$  está unido a su sitio de inhibición. No obstante, en nuestro laboratorio se ha encontrado que en vesículas de RS de conejo enriquecidas en triadas, las constantes de velocidad de liberación de  $Ca^{2+}$  inducidas por ATP<sup>2-</sup> en  $[Ca^{2+}]$  bajas ( $pCa > 8,0$ ) disminuyen a la mitad de lo observado en  $[Ca^{2+}]$  10  $\mu$ M ( $pCa$  5), sin cambiar la cantidad de  $Ca^{2+}$  liberada (Donoso e Hidalgo, 1993). La concentración de ATP<sup>2-</sup> mioplasmática del músculo esquelético es 3-9 mM, de lo cual más de un 90% está en la forma de Mg-ATP (Godt y Maughan, 1988). Del ATP<sup>2-</sup> total presente en el mioplasma sólo 0,3 a 0,9 mM está en la forma de ATP<sup>2-</sup> libre.

Cafeína: Cafeína es un clásico activador del canal de liberación de calcio del RS del músculo esquelético (Herrmann-Frank y cols., 1999). Se ha mostrado que el efecto de cafeína sobre el RyR aumenta en la presencia de  $ATP^{2-}$  y se inhibe por  $Mg^{2+}$  (Rousseau y cols., 1988). Además, cafeína interactúa cooperativamente con  $Ca^{2+}$  y  $ATP^{2-}$ , lo que indica una interacción alostérica entre estos diferentes tipos de sitios de unión (Sarközi y cols., 1998) y sugiere que cafeína aumenta la sensibilidad del RyR a sus activadores fisiológicos. Se mostró que cafeína activa los canales RyR aumentando la afinidad de sus sitios de unión de  $Ca^{2+}$  (Rousseau y cols., 1988; Moutin y Dupont, 1988; Meissner y cols., 1997). Además, se demostró que cafeína por sí misma es capaz también de activar el RyR en la ausencia de  $Ca^{2+}$  aunque se requiere una concentración mayor que 5 mM de cafeína (Rousseau y cols., 1988). Recientemente, se ha reportado que en músculo esquelético de rana, la cafeína aumenta la afinidad del sitio de activación por  $Ca^{2+}$  y disminuye la afinidad del sitio de inhibición (Murayama y cols., 2000), de manera que amplía el intervalo de  $[Ca^{2+}]$  para activar el RyR. Interesantemente, en la rana la cafeína disminuye levemente la afinidad para  $Mg^{2+}$  del sitio inhibitorio sin afectar la afinidad de unión de  $Mg^{2+}$  en el sitio de activación de  $Ca^{2+}$  (Murayama y cols., 2000). Se desconoce el efecto de cafeína sobre la afinidad de  $Mg^{2+}$  por los sitios de activación y de inhibición de  $Ca^{2+}$  en músculo esquelético de mamífero.

Se ha observado que, en concentraciones de hasta 10 mM, la cafeína no altera la función de las proteínas contráctiles (Allen y Westerblad, 1995), la dependencia de voltaje, las cinéticas ni la cantidad de movimientos de carga intramembrana (Delay y cols., 1986; Shirokova y Ríos, 1996a, 1996b). En cambio, en concentraciones  $\geq 5$  mM

cafeína sí ejercería un efecto sobre la Ca-ATPasa, puesto que disminuye en 60-70% la velocidad de la bomba (Allen y Westerblad, 1995).

En células musculares intactas o peladas (desprovistas de la membrana plasmática) la cafeína genera oscilaciones mecánicas que se deben a la liberación de calcio oscilatoria desde el RS (Fabiato y Fabiato, 1978; Herrmann-Frank, 1989; Wyskovsky, 1994).  $ATP^{2-}$  es un componente esencial en la generación de oscilaciones inducidas por cafeína (Wyskovsky, 1994). En músculos que oscilaron se observó que luego de la adición de cafeína, se libera un factor de bajo peso molecular que induce oscilaciones mecánicas en fibras de músculo de anfibio y activa la liberación de calcio y los canales RyR de músculo de mamífero (Kumbaraci y Nastuk, 1982; Herrmann-Frank y Meissner, 1989). Este factor endógeno de bajo peso molecular se ha denominado oscilógeno y presenta una absorción máxima a 245 nm (Kumbaraci y Nastuk, 1982). Posteriormente se mostró que probablemente es un péptido pequeño que tiene un peso molecular >1800 daltons (Herrmann-Frank y Meissner, 1989).

Oxido-reducción: Se ha observado que la oxidación de grupos tioles (SH) críticos del RyR produce los siguientes efectos: (a) activa el mecanismo de liberación de  $Ca^{2+}$  del músculo esquelético induciendo liberación de  $Ca^{2+}$  desde vesículas de RS (Trimm y cols, 1986; Zaidi y cols, 1989; Salama y cols., 1992; Abramson y cols, 1995), (b) aumenta la actividad de los canales RyR incorporados en bicapas planas de lípidos (Abramson y cols., 1995; Favero y cols., 1995; Marengo y cols., 1998), y (c) modifica la unión de ryanodina a membranas de RS (Abramson y cols., 1995; Favero y cols., 1995; Aghdasi y cols., 1997; Suko y Hellman, 1998). Inversamente, la adición de agentes que

reducen grupos tioles, cierran el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  y disminuyen la unión de ryanodina (Trimm y cols., 1986; Zable y cols., 1997; Marengo y cols., 1998). A partir de experimentos realizados con maleimida fluorescente, Liu y cols. (1994) mostraron que la reactividad de los grupos tioles hiperreactivos es muy sensible a la concentración de moduladores del canal RyR, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y cafeína. Posteriormente, Xia y cols. (2000) demostraron que los grupos tioles del RyR1 tienen un potencial redox bien definido que es sensible a las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y cafeína. También mostraron que en un ambiente con mayor poder oxidante hay una gran estimulación del RyR; mientras que en ambientes con mayor poder reductor, hay un grado relativamente pequeño de activación del canal por  $\text{Ca}^{2+}$ . Una oxidación extensa de grupos tioles en triadas activamente cargadas con calcio, provocó una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de  $[\text{Mg}^{2+}]$  1 mM con la misma constante de velocidad que se obtuvo en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , lo que indica que la oxidación extensa de grupos tioles suprime completamente el efecto inhibitorio de  $\text{Mg}^{2+}$  en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Donoso y cols., 2000). Por otro lado, se mostró que la actividad del canal depende del número de grupos tioles oxidados. De las 100 cisteínas presentes en cada subunidad RyR (Takeshima y cols., 1989), 50 tienen sus grupos tioles libres (en estado reducido) (Eu y cols., 2000), en condiciones experimentales comparables al músculo en reposo. La oxidación de ~10 tioles/subunidad (a ~38 tioles libres/subunidad de RyR) tiene poco efecto en la actividad del canal, con una oxidación mayor (a ~23 tioles libres/subunidad) la actividad del canal aumenta reversiblemente, y al oxidarlo aun más (a ~13 tioles libres/subunidad) lo inactiva irreversiblemente (Sun y cols., 2001).

Grupos tioles reactivos del RyR participan en su interacción con triadina permitiendo la formación de complejos de alto peso molecular (Liu y cols., 1994; Liu y Pessah, 1994) y además participan en la unión de RyR con calmodulina (Zhang y cols., 1999; Moore y cols., 1999). Por lo tanto, es esperable que todas las interacciones que involucren grupos tioles se verán afectadas por el potencial redox del RyR y pueden formar parte del mecanismo de modulación del canal.

## **HIPOTESIS**

Sobre la base de los antecedentes presentados se propone que: 1) en vesículas aisladas de RS enriquecidas en triadas de músculo esquelético de conejo, el  $Mg^{2+}$  inhibe la liberación de calcio inducida por cafeína modulando la cinética de este proceso de liberación, lo que además depende directamente del estado redox de los canales de calcio/RyR; y 2) la disociación del  $Ca^{2+}$  unido desde calsecuestrina es suficientemente rápida, de modo que no es una etapa limitante en el proceso de liberación de  $Ca^{2+}$ .

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Caracterizar la liberación de calcio inducida por cafeína en vesículas aisladas de RS de músculo esquelético de conejo enriquecidas en triadas.

2. Estudiar el efecto de  $Mg^{2+}$ , Mg-ATP, agentes óxido-reductores y calcio luminal sobre la liberación de calcio inducida por cafeína en las vesículas previamente aisladas.
3. Aislar vesículas de RS de músculo esquelético de conejo depletadas de calsecuestrina, para estudiar si éstas difieren en la cinética de liberación de calcio.
4. Aislar vesículas de RS de músculo esquelético de conejo enriquecidas en triadas y permeabilizadas que conserven las proteínas características de la estructura triádica.
5. Obtener una preparación de fragmentos de membranas del RS de la zona de unión del retículo con el T-T, exenta de la bomba de calcio, con y sin calsecuestrina.
6. Estudiar en las preparaciones obtenidas y en calsecuestrina purificada, la cinética de disociación del calcio unido a éstas y los cambios de fluorescencia intrínseca asociados.

## MATERIALES Y METODOS

### *Aislamiento de vesículas de retículo sarcoplasmático de conejo*

Se aislaron vesículas de RS pesado, enriquecidas en triadas desde músculo esquelético de conejo, de acuerdo al procedimiento descrito por Hidalgo y cols. (1993). Brevemente, los músculos rápidos de las piernas y espalda se limpiaron de tejido conectivo y se picaron finamente. Luego, se homogeneizaron en una licuadora comercial en dos ciclos alternados de 30 y 20 segundos, con una pausa de 30 segundos, en 4 volúmenes de Solución (1) (para la composición de las soluciones ver Tabla 1) a 4 °C. El homogeneizado se sedimentó a 1.500 x g por 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de 8 telas de gasa de algodón y se sedimentó a 17.000 x g por 30 minutos. El sedimento obtenido fue homogeneizado en 4 volúmenes de tampón A en un homogeneizador de vidrio-vidrio y se centrifugó a 1250 x g por 30 minutos. El sobrenadante resultante se sedimentó a 17.000 x g por 30 minutos y el sedimento obtenido se homogeneizó con 200 mL de Solución (2) en un homogeneizador de vidrio-vidrio. Este homogeneizado se centrifugó a 17.000 x g por 30 minutos y el sedimento final se homogeneizó en tampón B. Las vesículas así obtenidas se congelaron rápidamente por inmersión en N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -80 °C por períodos no superiores a un mes.

**Tabla 1**

**Composición de las soluciones**

| <b>Solución</b> | <b>en mM</b>   |
|-----------------|--|
| 1               | KCl 150, MgCl <sub>2</sub> 5, M-T <sup>a</sup> pH 6,8, IP <sup>c</sup>   |
| 2               | Sacarosa 300, M-T <sup>a</sup> pH 7,0, IP <sup>d</sup>   |
| 3               | EGTA 1, sacarosa 300, Tris HCl 20 pH 8, ditiotreitól 3, IP <sup>d</sup>  |
| 4               | M-T <sup>a</sup> pH 7,2, KCl 100, IP <sup>d</sup>  |
| 5               | Tritón-H 0,02%, M-T <sup>a</sup> pH7,2, KCl 100  |
| 6               | Sacarosa 300, M-T <sup>a</sup> pH 6,8, IP <sup>d</sup>   |
| 7               | CaCl <sub>2</sub> 2,2, M-T <sup>a</sup> pH 7,2, KCl 100, IP <sup>d</sup>   |
| 8               | NaCl 500, M-T <sup>b</sup> pH 7,2, EGTA 0,1, ditiotreitól 1, NaN <sub>3</sub> 0,02%  |
| 9               | M-T <sup>a</sup> pH 7,2, KCl 100   |
| 10              | KCl 100, fosfocreatina 5, creatina fosfoquinasa 5 UI/mL, M-T <sup>a</sup> pH 7,2, Calcium Green-2 90 nM ó Fluo 5N 0,84 μM                |
| 11              | KCl 100, CaCl <sub>2</sub> 3 más <sup>45</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mCi/mmol, M-T <sup>a</sup> pH 6,8                                    |
| I               | MgCl <sub>2</sub> 1,81, ATP 1,5, KCl 100, M-T <sup>a</sup> pH 7,2, fosfocreatina 5, creatina fosfoquinasa 5 UI/mL, Calcium Green-2 90 nM |
| II              | Cafeína 41,8, MgCl <sub>2</sub> 1,81, ATP 1,5, KCl 100, M-T <sup>a</sup> pH 7,2  |
| III             | MgCl <sub>2</sub> 6,66, ATP 5, fosfocreatina 10, creatina fosfoquinasa 10 UI/mL, M-T <sup>a</sup> pH7,2, KCl 100, Calcium Green-2 180 nM |
| IV              | Cafeína 8 mM, M-T <sup>a</sup> pH 7,2  |
| V               | CaCl <sub>2</sub> 1, M-T <sup>a</sup> pH 7,2, KCl 100  |
| VI              | BAPTA 13,2, Calcium Green-2 100 nM, M-T <sup>a</sup> pH 7,2, KCl 100   |
| VII             | CaCl <sub>2</sub> 2,2, M-T <sup>a</sup> pH 7,2, KCl 100  |
| VIII            | BAPTA 0,286, Calcium Green-2 1 μM, M-T <sup>a</sup> pH 7,2, KCl 100  |

M-T<sup>a</sup>: Mops-Tris 20 mM.

M-T<sup>b</sup>: Mops-Tris 10 mM.

IP<sup>c</sup>: cóctel de inhibidores de proteasas: leupeptina 1 μg/mL, benzamidina 0,8 mM, pepstatina 1 μg/mL, PMSF 1 mM.

IP<sup>d</sup>: cóctel de inhibidores de proteasas: leupeptina 1 μg/mL, benzamidina 0,4 mM.

### ***Extracción de calsecuestrina de las vesículas aisladas de RS***

Para obtener vesículas sin calsecuestrina, las vesículas de RS se incubaron toda la noche a 4 °C en solución de extracción (Solución (3)). Luego se centrifugaron a 17.000 x g durante 35 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en Solución (4). Luego se eliminó el EGTA remanente separando las vesículas del EGTA por fraccionamiento a través de 3 mL de una columna de agarosa (Bio-Gel A-1.5m) pre-equilibrada con Solución (4) y se eluyó con la misma solución. Estas vesículas sin calsecuestrina se utilizaron dentro de 24 horas o, alternativamente, se les agregó sacarosa (0,3 M final) y se congelaron por inmersión en N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -80 °C para ser utilizadas dentro de una semana.

Para obtener vesículas control, las vesículas de RS se incubaron toda la noche en solución de extracción pero sin EGTA. El resto del procedimiento fue igual que lo descrito para la extracción de la calsecuestrina.

### ***Permeabilización de las vesículas de RS***

Las vesículas aisladas se solubilizaron con concentraciones crecientes de los detergentes no iónicos Tritón X-100 y Tritón X-100 Hidrogenado (Tritón-H), del detergente iónico deoxicolato de sodio y con el glicósido saponina. Se realizaron titulaciones con pequeñas adiciones de cada detergente midiendo la turbidez de las vesículas a 350 nm y 540 nm. Posteriormente, para visualizar la composición proteica de las vesículas solubilizadas, se observó el patrón electroforético de los sedimentos y los sobrenadantes de la solubilización con cada detergente.

De los detergentes probados se seleccionó Tritón-H, ya que no sólo permeabilizó las vesículas manteniendo las proteínas vesiculares asociadas a la triada, sino que también fue ventajoso sobre los otros detergentes porque no es fluorescente y carece de absorbancia UV, por lo que no interfiere en los ensayos espectroscópicos.

Para los experimentos espectrofotométricos, las vesículas se permeabilizaron incubándolas en Solución (5) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 17.000 x g por 30 minutos y el sedimento se resuspendió en tampón B. Estas vesículas permeabilizadas se congelaron por inmersión en N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -80 °C para ser utilizadas dentro de una semana.

#### ***Aislamiento de membranas de la zona de unión (JFM) del RS terminal***

Las membranas de la zona de unión (JFM) del RS terminal se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito por Costello y cols. (1986) con algunas modificaciones. Brevemente, 3,3 mg/mL de vesículas aisladas de RS de conejo se incubaron por 10 minutos, a 4 °C, en Solución (6) más CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Luego se agregó Tritón X-100 desde una solución stock 10% (v/v) hasta obtener una concentración final de 0,5% y se agitó vigorosamente utilizando un agitador vortex. Se incubó durante 20 minutos a 4 °C agitando cada 5 minutos en agitador vortex. Se centrifugó a 48.000 x g durante 1 hora y el sedimento se resuspendió en Solución (6). A la mitad de estas membranas (JFM) se les extrajo la calsecuestrina según el método descrito a continuación. La fracción remanente de JFM se congeló por inmersión en N<sub>2</sub> líquido y se guardó a -80 °C para utilizarla dentro de una semana.

### ***Extracción de calsecuestrina de las JFM***

A las JFM se les agregó EGTA desde una solución stock 100 mM para obtener una concentración final de 3 mM, y suficiente Tris en polvo hasta obtener pH 8,0. Se incubó por 10 minutos a 4 °C y luego se centrifugó a 48.000 x g durante 1 hora. El sedimento se resuspendió en Solución (6) y las JFM sin calsecuestrina resultantes se congelaron por inmersión en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C para ser utilizadas dentro de una semana.

### ***Diálisis de las membranas de la zona de unión (JFM)***

Las JFM se dializaron durante 36 horas a 4 °C en Solución (7). Las JFM sin calsecuestrina se dializaron en la misma forma. Posteriormente, estas membranas dializadas se utilizaron para medir la cinética de disociación del calcio unido a calsecuestrina, según se describe más adelante.

### ***Purificación de calsecuestrina***

La calsecuestrina se purificó por cromatografía en fenil sefarosa a partir de un extracto soluble en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de las vesículas de RS, de acuerdo al procedimiento descrito por Cala y Jones (1983) con algunas modificaciones. Brevemente, las vesículas de RS enriquecidas en triadas se centrifugaron a 70.000 x g por 30 min. El sedimento se resuspendió a una concentración de proteínas de 1-2 mg/mL en una solución fría de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM, pH 11,4. Se incubó en hielo durante 1 hora y se centrifugó a 100.000 x g durante 30 min. Al sobrenadante (extracto de carbonato) se le agregaron reactivos en polvo para obtener Mops 50 mM, NaCl 0,5 M y ditiotretitol 1 mM. El pH se ajustó a 7,2

con HCl concentrado. La mezcla se aplicó sobre 20 mL de una columna de fenil sefarosa CL-4B pre-equilibrada con Solución (8). La columna se lavó varias veces con la Solución (8) y luego se eluyó con esta solución que además contenía  $\text{CaCl}_2$  10 mM. Se colectaron fracciones de 1 mL y se midió la absorbancia a 278 nm. Las fracciones que contenían la proteína se juntaron y se concentraron en microconcentradores Centricon YM-30 (Amicon, Millipore) centrifugando a 5.000 x g por el tiempo necesario para disminuir el volumen a aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  (3-4 ciclos de 30 minutos cada uno). Luego se realizaron sucesivos lavados con EGTA 5 mM y finalmente, la calsecuestrina purificada se dializó por medio de cinco lavados con 2 mL cada uno, con Solución (9) y posterior centrifugación a 5000 x g para disminuir el volumen a 500  $\mu\text{L}$ . La proteína purificada en solución se almacenó en alícuotas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### ***Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)***

Se prepararon geles de 0,75 mm de espesor utilizando para los geles concentrador y separador el sistema de soluciones tampón descrito por Laemmli (1970). Para el gel concentrador se utilizó acrilamida 5% y para los geles separadores se prepararon gradientes lineales de acrilamida del 2 al 12% o un gel al 7%. Después de la electroforesis, los geles se fijaron y se tiñeron durante toda la noche a temperatura ambiente en una solución que contenía metanol 50%, ácido acético 10%, azul de Coomassie brillante R-250 0,15%. Luego se lavaron varias veces con ácido acético 7,5% y metanol 7,5%. Algunos geles fueron completamente destañados para una posterior tinción con Stains All (Campbell y cols., 1983). Para destañar se utilizó metanol 50% durante toda la noche a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  y luego se lavó exhaustivamente con isopropanol 25%

para remover el SDS. Posteriormente se tiñó el gel en la oscuridad durante 48 horas con una solución que contenía Stains All 0,0025%, isopropanol 25%, formamida 7,5% y Tris base 30 mM, pH 8,8.

Algunos geles se tiñeron con plata. Para esto primero se fijaron con una mezcla de metanol 50% y ácido acético 10%, luego el gel se lava en metanol 50% durante toda la noche y al día siguiente se cambia dos veces esta solución para eliminar completamente el ácido acético. Se lava con agua destilada y se agrega una solución recién recién preparada que contiene: 31,5 mL de NaOH 0,1 N; 2,05 mL de NH<sub>3</sub> 14,8 N; 6,0 mL de AgNO<sub>3</sub> 20% y cantidad suficiente de agua para 150 mL. Se incuba por 15 minutos y luego se lava con agua destilada. Para revelar se utiliza una solución recién preparada que contiene: 2,5 mL de ácido acético 1%; 0,3 mL de formaldehído 35% y cantidad suficiente de agua para 500 mL. Se agita durante 15 a 20 minutos en espera del revelado de las bandas.

Se determinó la cantidad relativa de calsecuestrina y Ca-ATPasa en las diferentes preparaciones por medio del análisis densitométrico de los geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Se utilizó el programa 1D Advanced (AAB Software, Advanced American Biotechnology 1166E, Fullerton, USA).

### ***Experimentos de captación y liberación de calcio***

Los experimentos se realizaron a 22 °C en un espectrofotómetro de fluorescencia (Jobin Yvon-Spex, Fluoro Max-2) que está provisto de un sistema para controlar la temperatura. Se determinaron los cambios de [Ca<sup>2+</sup>] extravesicular con Calcium Green-2 y en algunas ocasiones se utilizó Fluo-5N. La emisión fluorescente de Calcium Green-2

se midió a 531 nm con una longitud de onda de excitación de 506 nm. Para Fluo-5N se utilizaron longitudes de onda de excitación de 492 nm y de emisión de 530 nm. Las vesículas enriquecidas en triadas se diluyeron a 0,2 mg/mL en solución de captación (Solución (10)). La adición de las vesículas (0,2 mg/mL) aumentó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre del medio de una concentración basal de 2 a 5  $\mu\text{M}$  a una concentración de  $23,8 \pm 5,9 \mu\text{M}$ , que se determinó con un electrodo de calcio. Al calcular este nivel de calcio considerando la  $K_D$  para calcio de Fluo-5N se obtuvo un valor de 25  $\mu\text{M}$  (ver más adelante). Se inició la captación de calcio agregando un pequeño volumen de una solución que contenía  $\text{MgCl}_2$  más  $\text{ATP}^{2-}$  (sal sódica) de acuerdo a las concentraciones indicadas en la Tabla 2. La liberación de calcio se inició con la adición de cafeína o, en algunos casos, de AMP-PNP, en las concentraciones señaladas y a los tiempos indicados en cada experimento.

Para calcular  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre,  $[\text{ATP}^{2-}]$  libre,  $[\text{Mg-ATP}]$  y  $[\text{AMP-PNP}]$  presentes durante la liberación de calcio se utilizó el programa WinMaxC ([www.stanford.edu/~cpatton/winmaxc2.html](http://www.stanford.edu/~cpatton/winmaxc2.html)) y las constantes proporcionadas en el archivo bers.ccm.

### ***Determinación de las constantes de velocidad inicial de la liberación de calcio inducida por cafeína***

Para determinar la cinética de liberación de calcio inducida por cafeína se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia de flujo detenido, modelo SF.17MV de Applied Photophysics Ltd. (Leatherhead, U.K.). En todos los experimentos el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]$  extravésicular se determinó excitando a 506 nm y midiendo la emisión de fluorescencia

de Calcium Green-2 a través de un filtro de paso largo que corta en 530 nm (Oriel, Stratford, CT).

Las vesículas (0,2 mg/mL) se cargaron activamente con calcio durante 3 minutos a 25 °C antes de comenzar cada experimento, utilizando la solución I. (Para la composición de las soluciones ver Tabla 1). La liberación de calcio se inició mezclando en el espectrofotómetro de flujo detenido 10 volúmenes de la solución I con un volumen de la solución de liberación (solución II). Las concentraciones de  $MgCl_2$  y  $ATP^{2-}$  de las soluciones I y II se variaron de acuerdo a la Tabla 2 para obtener  $[Mg^{2+}]$  libre requerida en cada experimento.

La constante de velocidad de liberación (k) para cada experimento se determinó a partir de la liberación rápida inicial de calcio. La apertura transitoria de los canales RyR provoca un rápido flujo de  $Ca^{2+}$  a favor de su gradiente de concentración. Mientras los canales estén abiertos, esta liberación no es contrarrestada por la bomba de calcio, la Ca-ATPasa, ya que ésta tiene un flujo para calcio 1000 veces menor que la del canal RyR. Además, un requerimiento indispensable para la actividad de la bomba es un nivel de calcio  $\mu M$  (Inesi, 1985). Esta concentración sólo se alcanza una vez que se ha producido la liberación inicial a través de los canales RyR. Por lo tanto, al inicio de la liberación, cuando la mayoría de los canales están abiertos, sólo se obtendrá un flujo neto de salida que prácticamente no está siendo mermado por la bomba reticular.

*Experimentos con vesículas sin calsecuestrina:* Las vesículas, nativas, control o sin calsecuestrina, (0,4 mg/mL) se cargaron activamente con calcio durante 3 minutos a 25 °C en solución III. Luego, la solución III se mezcló (1:1) en el espectrofotómetro de flujo detenido con una solución de liberación (solución IV).

### ***Incubación de las vesículas de RS con reactivos redox***

Las proteínas vesiculares que contienen grupos SH reactivos se oxidaron incubando las vesículas de RS diluidas a 0,2 mg/mL en la solución de captación, durante 5 minutos a 37 °C (o en la condición especificada en la leyenda de las Figuras) con diferentes concentraciones de glutatión nitrosilado (GS-NO) o timerosal. El GS-NO se preparó mezclando (1:1) glutatión en su forma oxidada 0,1 M con NaNO<sub>2</sub> 0,2 M e incubando esta mezcla a 4 °C durante 15 minutos. La reducción de los grupos SH se realizó incubando las triadas con distintas concentraciones de glutatión en su forma reducida (GSH) en las mismas condiciones utilizadas para la oxidación.

### ***Determinación de la acumulación de calcio vesicular***

Para medir la cantidad de calcio activamente acumulada por las vesículas en diferentes condiciones experimentales, se filtraron las vesículas activamente cargadas con calcio de acuerdo a lo descrito anteriormente, excepto que la solución de captación contenía cantidades trazas de <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (actividad específica 5-10 mCi/mmol). Las vesículas se filtraron a través de filtros Millipore (AA 0,8 µm) bajo vacío, en diferentes tiempos después de iniciada la captación. El filtrado se colectó y se determinó su radioactividad en un contador de centelleo líquido. La radioactividad asociada inespecíficamente a los filtros fue menos del 4% del total de la radioactividad presente.

### ***Carga pasiva de calcio al equilibrio***

Las vesículas de RS (0,6 mg/mL) se incubaron en la solución de carga pasiva (solución (11)). Las vesículas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente,

tiempo al cual alcanzan el equilibrio con las concentraciones presentes en el medio de incubación (Donoso y cols., 1995). Posteriormente, 50  $\mu\text{L}$  de la solución que contenía las vesículas se diluyó en 1 mL de la misma solución de carga pasiva pero sin calcio radioactivo y se filtró a través de filtros Millipore (AA 0,8  $\mu\text{m}$ ). Los filtros se lavaron con 5 mL de solución de carga pasiva no radioactiva y su radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido.

### *Mediciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre*

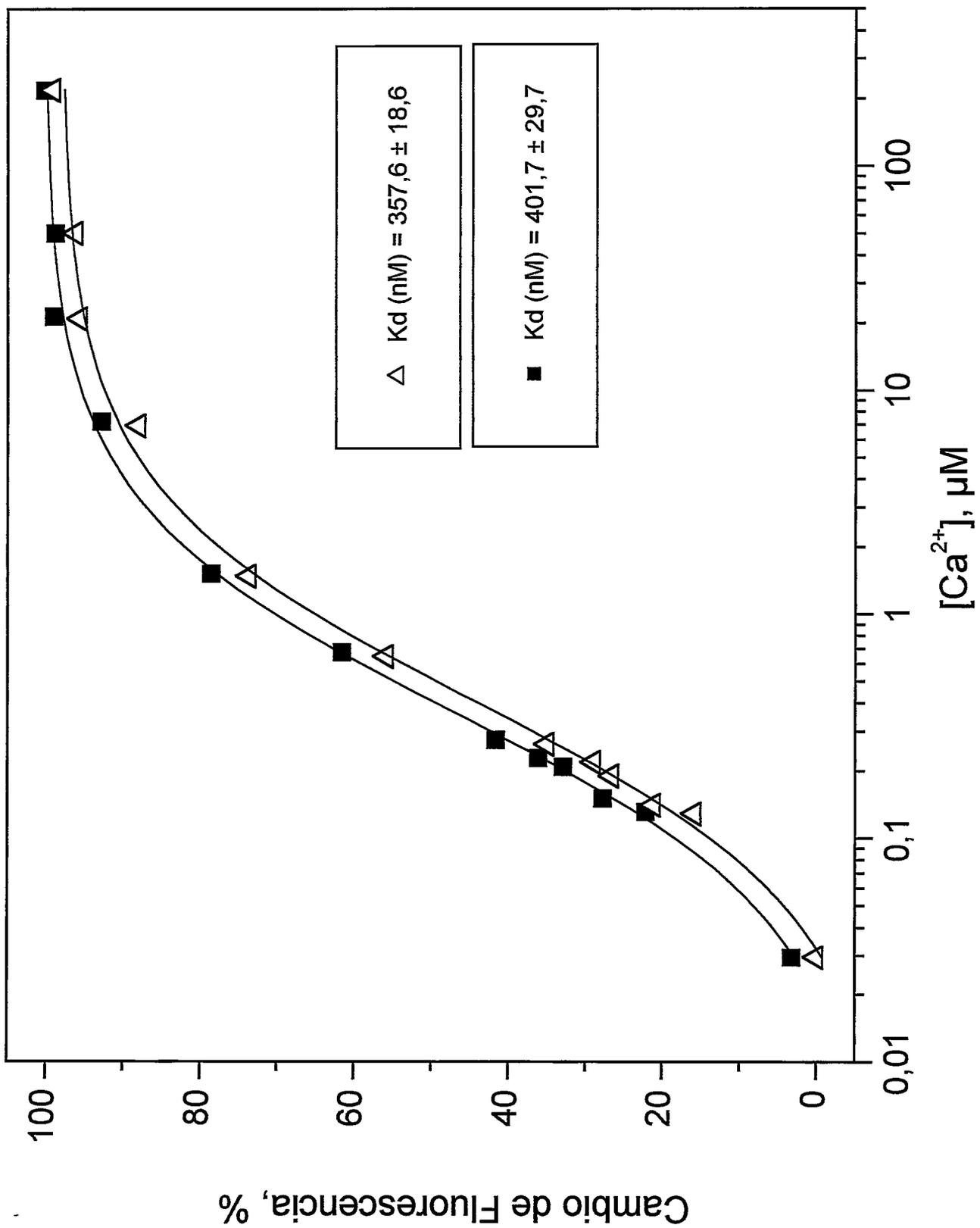
La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre de las soluciones que no contenían  $\text{Mg}^{2+}$  se determinó con un electrodo de calcio (Orion, Beverly, MA). Para calibrar el electrodo se utilizó un kit comercial estándar (WPI, Sarasota, FL). La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre de las soluciones que contenían  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  se determinó con Calcium Green-2 o con Fluo-5N. Los valores de las  $K_D$  para  $\text{Ca}^{2+}$  de cada indicador se determinaron con distintas concentraciones de calcio tamponadas con EGTA o HEDTA en la solución (9) a 22 °C. En estas condiciones experimentales, la  $K_D$  para calcio de Calcium Green-2 fue  $401,7 \pm 29,7$  nM y en presencia de vesículas (0,2 mg/mL) fue de  $357,6 \pm 18,6$  nM (ver Figura 1). La  $K_D$  para Fluo-5N fue de  $88,6 \pm 6,2$   $\mu\text{M}$  y en presencia de vesículas (0,2 mg/mL) cambió a  $83,9 \pm 7,7$   $\mu\text{M}$ . Para cada experimento se cuantificó la fluorescencia máxima y la fluorescencia mínima mediante la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM y luego EGTA 2 mM, respectivamente. La concentración de calcio libre se calculó a partir de la ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}} = K_D (F - F_{\text{min}})/(F_{\text{máx}} - F),$$

### **FIGURA 1.**

#### **Determinación de la $K_D$ para calcio del indicador fluorescente de calcio Calcium Green-2.**

La emisión fluorescente de Calcium Green-2 se registró a 531 nm excitando con una longitud de onda de 504 nm. Las soluciones contenían Calcium Green-2 90 nM y distintas  $[Ca^{2+}]$  libre en Mops-Tris 20 mM, pH 7,2, KCl 0,1 M, en presencia de vesículas de RS 0,2 mg/mL (triángulos vacíos) o en la ausencia de proteína (cuadrados llenos). La razón absoluta  $F_{máx}/F_{mín}$  fue de 10,44 en ausencia de vesículas y de 8,15 en presencia de vesículas.



donde  $F$  corresponde a la intensidad de fluorescencia medida en una longitud de onda única,  $K_D$  es la constante de disociación del indicador de calcio,  $F_{\text{máx}}$  y  $F_{\text{mín}}$  corresponden a las intensidades de fluorescencia máxima y mínima, respectivamente.

La adición de cafeína 3,8 a 4 mM disminuyó en un 10% la fluorescencia de Calcium Green-2. Con cafeína 10 mM la fluorescencia disminuyó en 15% y con la adición de cafeína 1 y 2 mM la fluorescencia bajó en 3% y 5%, respectivamente. Esto se consideró al calcular los cambios en  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre extravesicular en la presencia de cafeína.

### ***Mediciones de Fluorescencia Intrínseca***

Para las mediciones de fluorescencia intrínseca en estado estacionario se registraron espectros de fluorescencia de emisión a 22 °C en un espectrofotómetro de fluorescencia Fluoro Max-2. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm. El ancho de banda de los monocromadores de excitación y de emisión fue de 5 nm. Para evitar la precipitación de la calsecuestrina al unir calcio, la concentración de la proteína en solución se mantuvo siempre  $\leq 30 \mu\text{g/mL}$ . Para las vesículas de RS enriquecidas en triadas y vesículas de RS longitudinal se utilizó la concentración de proteínas indicada en la leyenda de las Figuras. Todos los espectros se registraron en una solución (9) que además contenía la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  o de EGTA indicadas.

### ***Mediciones cinéticas de la disociación del calcio unido a calsecuestrina en solución o asociada a membranas***

Las mediciones cinéticas asociadas a la disociación del calcio unido a calsecuestrina se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia de flujo detenido, modelo SF.17MV.

*Calsecuestrina en solución:* La calsecuestrina purificada desde músculo esquelético de conejo se diluyó a 110  $\mu\text{g/mL}$  en solución V y se mezcló (10:1) en el espectrofotómetro con solución VI. En estas condiciones se calculó una  $[\text{Ca}^{2+}]$  inicial total de 867  $\mu\text{M}$ , siendo  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre de 300 nM.

*Calsecuestrina asociada a membranas:* Las JFM o JFM-Cs (3,3 mg/mL) que fueron dializadas en  $\text{CaCl}_2$ , según se describió previamente, y que estaban contenidas en una solución VII, se mezclaron (1:10) en el espectrofotómetro con la solución VIII.

Después de un tiempo muerto de 1-1,5 ms, los cambios en  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre se midieron usando una longitud de onda de excitación de 506 nm y un filtro de paso largo que corta la luz de emisión en 530 nm (Oriel, Stratford, CT). Los cambios en la fluorescencia intrínseca se midieron utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm y un filtro que corta en 320 nm. Todos estos experimentos se realizaron a temperatura ambiente (25 °C en promedio).

### ***Materiales***

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Calcium Green-2 y Fluo-5N fueron obtenidos de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Tritón X-100

Hidrogenado se obtuvo de Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA). Todos los demás reactivos fueron adquiridos en SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO).

## RESULTADOS

### I. LIBERACION DE CALCIO DESDE VESICULAS DE RETICULO SARCOPLASMATICO DE MUSCULO ESQUELETICO DE CONEJO

Como se describe en detalle en la sección de Materiales y Métodos, para los estudios de liberación de calcio las vesículas de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de conejo se cargaron activamente con  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de la Ca-ATPasa, la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo. La captación se inició con la adición de Mg-ATP a las vesículas en solución. Los experimentos se realizaron en celdas de espectrofluorímetro y los cambios de la concentración extravesicular de calcio se detectaron con un indicador de calcio en un espectrofluorímetro FluoroMax-2.

#### I.1. Cafeína produce una liberación transitoria de calcio seguida por oscilaciones.

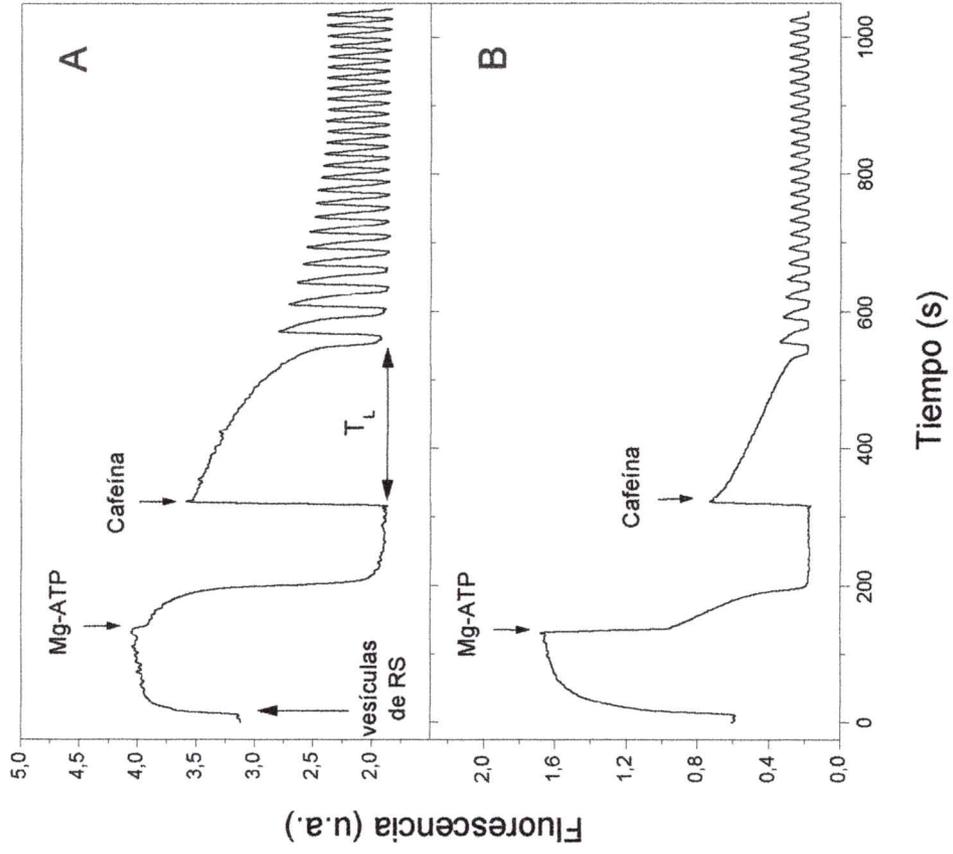
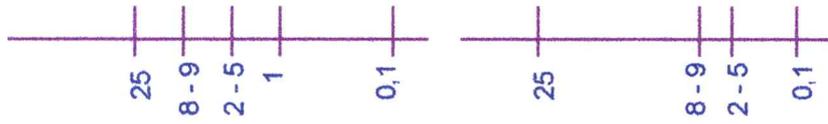
La adición de Mg-ATP 0,26 mM ( $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{libre}} = 0,1 \text{ mM}$ ) a las vesículas de RS (0,2 mg/mL) provocó una rápida captación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Figuras 2A y 2B). La fluorescencia de los indicadores de calcio del medio extravesicular, Calcium Green-2 y Fluo-5N disminuyó a niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$  que corresponden a aproximadamente 100 nM en 73,5 segundos. Este nivel de calcio se calculó a partir del valor de  $K_D$  de Calcium Green-2, y de los valores de fluorescencia máxima y fluorescencia mínima (Ver Materiales y Métodos). Al medir el calcio extravesicular con Fluo-5N se observó una rápida

## **FIGURA 2.**

### **Liberación de calcio inducida por cafeína desde vesículas de RS de conejo.**

La captación de calcio se inició por la adición de  $\text{MgCl}_2$  0,36 mM más ATP 0,45 mM ( $[\text{Mg}^{2+}]$  libre = 0,1 mM) en el tiempo indicado con las flechas. La liberación de calcio se indujo por la adición de cafeína 3,8 mM 3 minutos después de la adición de Mg-ATP. Los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre extravésicular se midieron con Calcium Green-2 (panel A) o con Fluo 5N (panel B). En el eje OY se indica la escala de calcio obtenida a partir de los valores de  $K_D$  de Calcium Green-2 y Fluo 5-N, que se utilizaron para calcular  $[\text{Ca}^{2+}]$  bajas ( $\leq 5 \mu\text{M}$ ) y altas ( $\geq 5 \mu\text{M}$ ), respectivamente.  $T_L$ : duración del primer evento de liberación de calcio.

**Ca,  $\mu\text{M}$**



captación inicial de calcio, luego de la adición de Mg-ATP (Figura 2B), lo que no se observó con el indicador Calcium Green-2 (Figura 2A), indicando que este colorante está prácticamente saturado en el momento que se inicia la captación, donde el nivel de calcio es de aproximadamente 25  $\mu\text{M}$ . Este nivel de calcio fue medido con un electrodo de calcio y además se calculó a partir del valor de  $K_D$  de Fluo-5N (Ver Materiales y Métodos). El indicador Fluo-5N fue menos efectivo que Calcium Green-2 en medir las concentraciones de calcio bajas, en concordancia con sus respectivos valores de constante de disociación (83,9  $\mu\text{M}$  para Fluo-5N y 357,6 nM para Calcium Green-2). En estas condiciones experimentales, las vesículas acumularon en promedio entre 100-130 nmoles de calcio por mg de proteína.

La adición de cafeína, luego de 3 minutos del inicio de la captación y cuando el calcio extravesicular era 100 nM, indujo una rápida y transitoria liberación del calcio acumulado. Al medir el calcio extravesicular con Fluo-5N, quedó de manifiesto que sólo se liberó una fracción del calcio acumulado por las vesículas, provocando un aumento del calcio extravesicular hasta 8-9  $\mu\text{M}$ . Esto indica que las vesículas liberaron entre 40 y 45 nmoles de calcio por mg de proteína, lo que fue confirmado con experimentos de filtración en vesículas cargadas con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

Luego del rápido aumento inicial del calcio extravesicular se observó una lenta disminución del calcio extravesicular, lo que indica un flujo neto de entrada de calcio a las vesículas. A los 4 minutos luego de la adición de cafeína, el calcio libre vuelve al nivel basal de 100 nM. Este primer evento de liberación se denominó  $T_L$  (ver Figura 2A).

Luego del primer evento transitorio de liberación y en la presencia constante de cafeína, se observaron eventos oscilatorios de liberación de calcio que duraron todo el tiempo del registro, los que fueron aumentando en frecuencia y disminuyendo en amplitud. La cantidad de calcio liberada en cada oscilación fue siempre más baja que la del primer evento transitorio de liberación y alcanzó un nivel de calcio no mayor que 1  $\mu\text{M}$ .

## **I. 2. Efecto de $[\text{Mg}^{2+}]$ libre y $[\text{Mg-ATP}]$ en la liberación de calcio inducida por cafeína.**

Se realizaron experimentos para investigar si cambiando las concentraciones tanto de  $\text{Mg}^{2+}$  libre como de  $\text{Mg-ATP}$  se modifica la liberación de calcio inducida por cafeína descrita anteriormente. En estos experimentos se mantuvo cuidadosamente constante la concentración de  $\text{ATP}^{2-}$  libre en el rango de 0,14 a 0,16 mM, ya que el  $\text{ATP}^{2-}$  por sí mismo estimula la liberación de calcio (Meissner, 1984; Smith y cols. 1986) y las oscilaciones de calcio (Wyskovsky, 1994).

Los experimentos se realizaron en el rango de  $[\text{Mg-ATP}]$  desde 0,12 mM a 5,82 mM que corresponden a  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre de 0,05 mM a 2,5 mM (Tabla 2). Como se ilustra en los cuatro registros mostrados en la Figura 3, el aumento de  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre y  $[\text{Mg-ATP}]$  aceleró la captación de calcio, disminuyó tanto  $T_L$  como la cantidad de calcio liberada por cafeína y produjo un cambio en la subsecuente respuesta oscilatoria.

En los registros de los paneles A, C y D de la Figura 3, al finalizar el primer evento de liberación transitorio inducido por la adición de cafeína, el nivel de fluorescencia es menor que antes de la adición de cafeína. Este efecto puede ser causa

**Tabla 2**

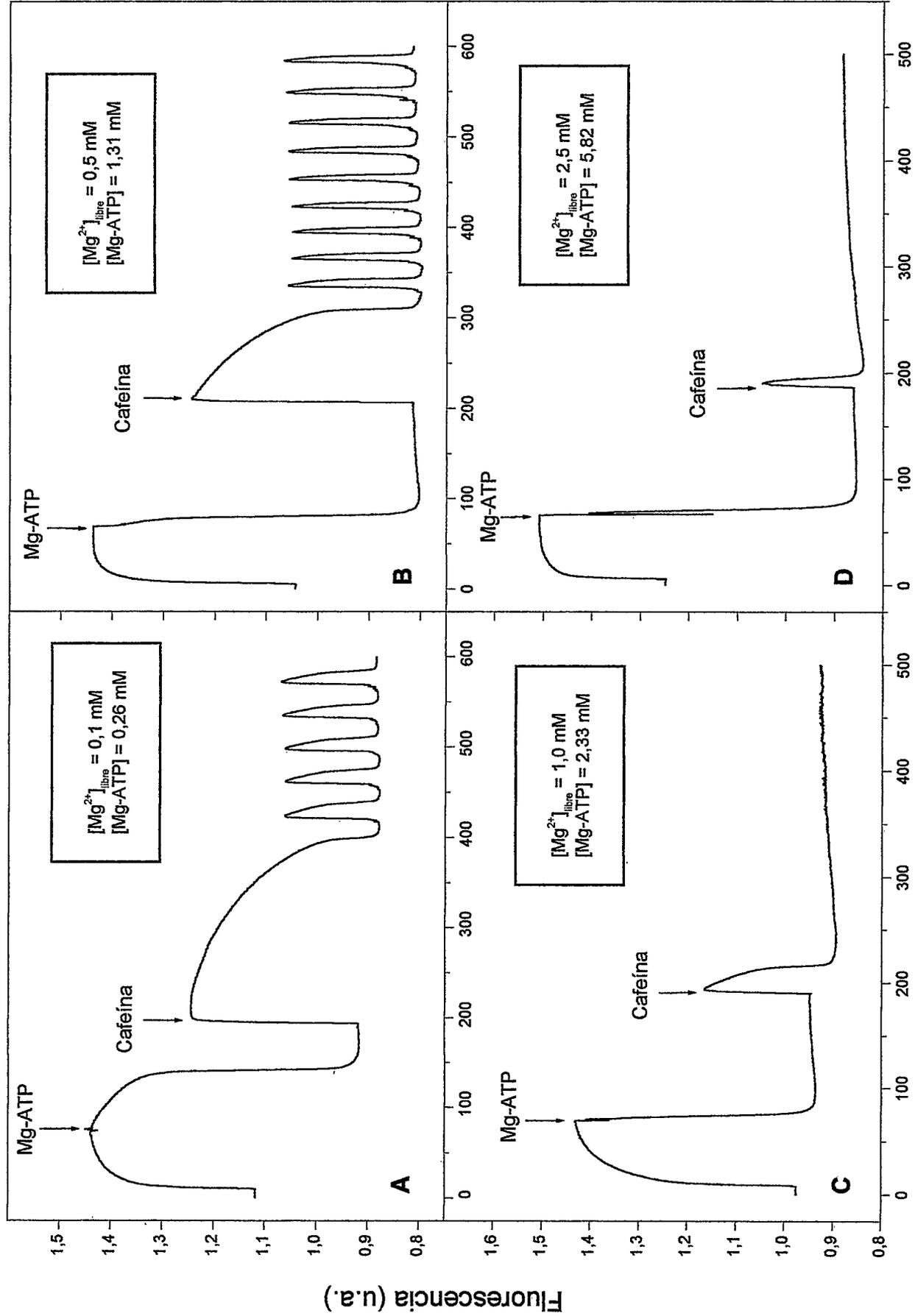
**Concentraciones de  $Mg^{2+}$ ,  $ATP^{2-}$  y Mg-ATP utilizadas  
en los experimentos de liberación de calcio**

| $[Mg^{2+}]$ libre<br>mM<br><i>calculado</i> | $[ATP^{2-}]$ libre<br>mM<br><i>calculado</i> | $[Mg-ATP]$<br>mM<br><i>calculado</i> | $[Mg^{2+}]$ total<br>mM<br><i>agregado</i> | $[ATP^{2-}]$ total<br>mM<br><i>agregado</i> |
|---|--|--------------------------------------|--|---|
| 0,05  | 0,147  | 0,12                                 | 0,17                                       | 0,3   |
| 0,1   | 0,156  | 0,26                                 | 0,36                                       | 0,45  |
| 0,5   | 0,157  | 1,31                                 | 1,81                                       | 1,5   |
| 1,0   | 0,14   | 2,33                                 | 3,33                                       | 2,5   |
| 2,5   | 0,14   | 5,82                                 | 8,33                                       | 6,0   |
| 1,27  | 0,22   | 4,72                                 | 6,0  | 5,0   |

**FIGURA 3.**

**Efecto de  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre y  $[\text{Mg-ATP}]$  en la liberación de calcio inducida por cafeína.**

Los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre extravesicular se midieron con Calcium Green-2. La captación de calcio se inició por la adición de Mg-ATP en los tiempos indicados por las flechas. Luego de 2 minutos de iniciada la captación, se indujo la liberación de calcio con la adición de cafeína 3,8 mM. En los paneles se indican las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  libre y Mg-ATP utilizadas en cada experimento.

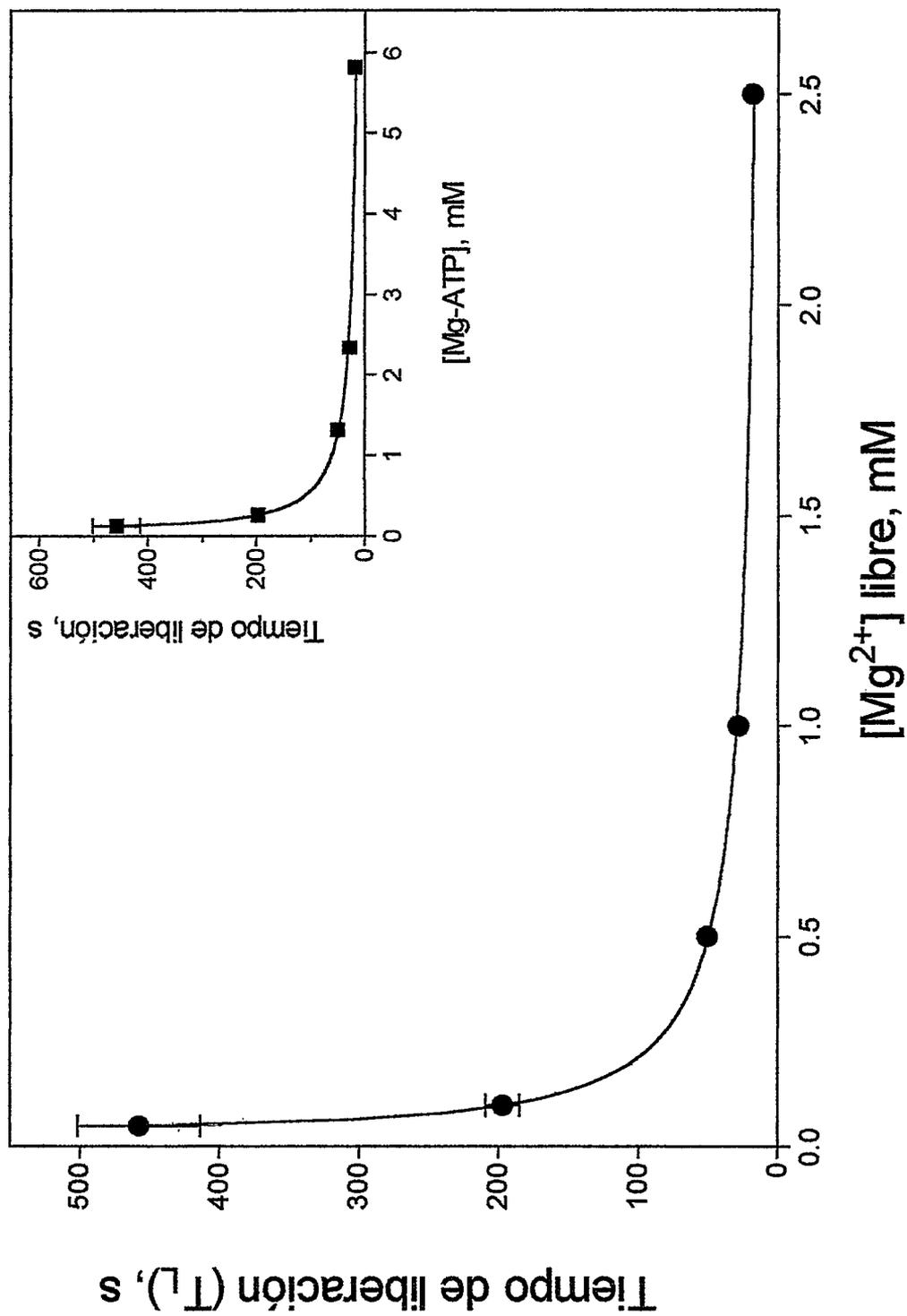


Tiempo (s)

**FIGURA 4.**

**Efecto de  $[Mg^{2+}]$  libre y  $[Mg-ATP]$  sobre el tiempo de liberación de calcio ( $T_L$ ) inducido por cafeína.**

Los datos se tomaron de experimentos como los ilustrados en la Figura 3. Para cada  $[Mg^{2+}]$  libre y  $[Mg-ATP]$  (inserto) se midió la duración del primer evento de liberación ( $T_L$ ) inducido por cafeína 3,8 mM.



del *quenching* de cafeína que resulta evidente sólo en algunos registros, cuando se produce una mayor captación del calcio extravesicular. En algunos experimentos o durante el transcurso de ellos, la fluorescencia disminuyó hasta niveles que equivalen a  $\text{Ca}^{2+}$  200 nM y en otros casos alcanzó concentraciones menores (hasta 100 nM). En otros registros mostrados más adelante, se observa también que no siempre se llega a un mismo nivel de fluorescencia basal. No obstante, esto no afecta el nivel de calcio, puesto que para calcular  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$  de cada experimento, se consideró el *quenching* de cafeína y las señales de fluorescencia máxima y mínima (ver Materiales y Métodos).

Los cambios que se observan en la Figura 3 en el valor de  $T_L$ , luego de la adición de cafeína, podrían ser producto del aumento de  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre, como se ilustra en la Figura 4 o del aumento de  $[\text{Mg-ATP}]$ , como se muestra en el inserto de la Figura 4. Para separar ambos efectos, se realizó una serie de experimentos manteniendo relativamente constante  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre y  $[\text{ATP}^{2-}]$  libre y aumentando  $[\text{Mg-ATP}]$  desde 0,26 a 0,60 mM (Tabla 3). Si la disminución de  $T_L$  se debiera al aumento de  $[\text{Mg-ATP}]$ , los datos experimentales mostrarían una disminución de  $T_L$ . Sin embargo, ante el aumento de  $[\text{Mg-ATP}]$ , el  $T_L$  se mantuvo relativamente constante e incluso tendió a aumentar. Estos resultados indican que la disminución de los valores de  $T_L$  observados en la serie de experimentos mostrados en la Figura 3 se deben probablemente al aumento de  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre y no al aumento de  $[\text{Mg-ATP}]$ . El aumento de  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre desde 0,05 mM a 2,5 mM produjo una disminución de  $T_L$  de 25 veces, desde 460 a 18,5 s. La reducción más pronunciada se observó cuando  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre aumentó desde 0,05 a 0,5 mM (Figura 4).

En la Figura 3 se observa también que con el aumento de  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre se inhibe la subsecuente respuesta oscilatoria a cafeína. Con  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre 1,0 mM ya se ha

**Tabla 3****Tiempo de liberación  $T_L$  medido en diferentes concentraciones de Mg-ATP**

| [Mg-ATP]<br>mM | [Mg <sup>2+</sup> ] libre<br>mM | [ATP <sup>2-</sup> ] libre<br>mM | $T_L$ experimental ♦<br>s | $T_L$ esperado*<br>s |
|----------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------|
| 0,26           | 0,10                            | 0,16                             | 197 ± 12                  | 209                  |
| 0,39           | 0,12                            | 0,20                             | 174 ± 12                  | 139                  |
| 0,43           | 0,11                            | 0,24                             | 261 ± 35                  | 126                  |
| 0,60           | 0,12                            | 0,30                             | 241 ± 14                  | 91                   |

\* Los valores esperados de  $T_L$  fueron obtenidos del ajuste de regresión no lineal a una ecuación hiperbólica de los datos del inserto de la Figura 4.

♦ Los datos de  $T_L$  experimental representan los valores promedio de dos determinaciones.

inhibido completamente esta respuesta. En otras preparaciones vesiculares se necesitó mayor  $[Mg^{2+}]$  libre para detener las oscilaciones, pero en todos los casos con  $[Mg^{2+}]$  libre 2,5 mM el comportamiento oscilatorio fue completamente inhibido.

### **I. 3. AMP-PNP produce una liberación de calcio transitoria con un patrón oscilatorio poco frecuente.**

Al inducir la liberación de calcio con otro agonista del canal, AMP-PNP (5'-adenililimidodifosfato), un análogo no hidrolizable de  $ATP^{2-}$ , también se observó una liberación transitoria de calcio, como se muestra en los registros ilustrados en la Figura 5. A vesículas cargadas con Mg-ATP 2,3 mM ( $[Mg^{2+}]$  libre=1,0 mM) se les agregó AMP-PNP 1,4 mM, lo que bajó  $[Mg^{2+}]$  libre desde 1,0 mM a 0,26 mM (Figura 5A) e indujo una liberación rápida y transitoria de calcio con un  $T_L$  de 184 s.

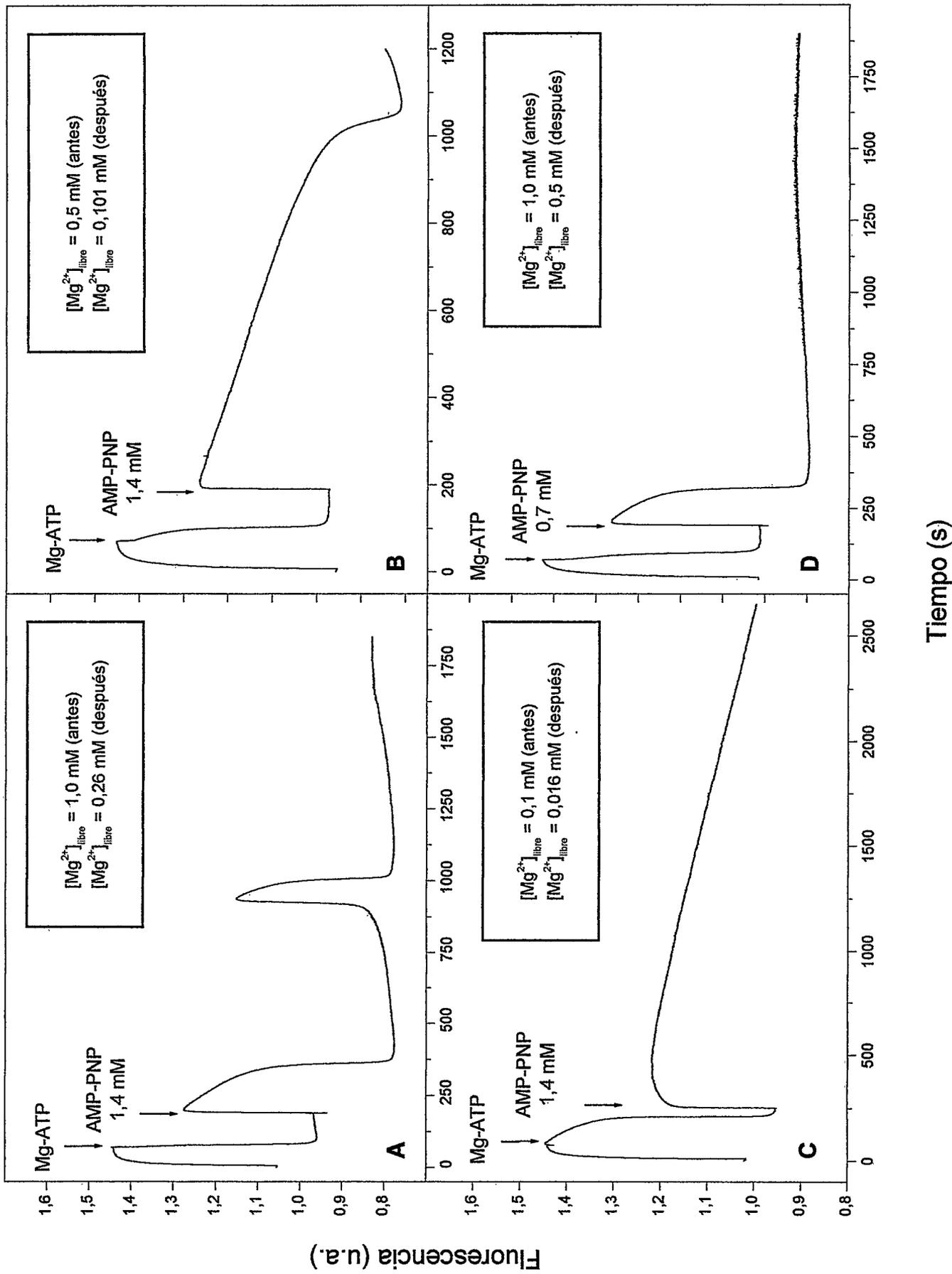
La disminución de  $[Mg^{2+}]$  libre al inducir la liberación de calcio con AMP-PNP, produjo un aumento sobre  $T_L$  similar al observado con cafeína. En vesículas cargadas con Mg-ATP 1,31 mM, la adición de AMP-PNP a la solución extraventricular redujo  $[Mg^{2+}]$  libre desde 0,5 a 0,101 mM y produjo un evento de liberación con un  $T_L$  mayor que el observado en la condición anterior, con un valor de 850 s (Figura 5B). Cuando se indujo la liberación con AMP-PNP en la presencia de  $[Mg^{2+}]$  libre 0,016 mM, el valor de  $T_L$  fue mucho más prolongado y se extendió a más de 2400 s (Figura 5C).

La adición de AMP-PNP también provocó una respuesta oscilatoria. En la Figura 5A se observa que el primer evento de liberación transitorio fue seguido de un evento oscilatorio de menor amplitud. A vesículas cargadas en las mismas condiciones anteriores se les agregó AMP-PNP 0,7 mM (Figura 5D) lo que bajó  $[Mg^{2+}]$  libre desde

## **FIGURA 5.**

### **Liberación de calcio inducida por AMP-PNP en distintas $[Mg^{2+}]$ libre.**

Los cambios de  $[Ca^{2+}]$  libre extravesicular se midieron con Calcium Green-2. La captación de calcio se inició por la adición de Mg-ATP 2,33 mM (paneles A y D); ó Mg-ATP 1,31 mM (panel B); ó Mg-ATP 0,26 mM (panel C), en los tiempos indicados por las flechas. La liberación de calcio se indujo con la adición de AMP-PNP 1,4 mM (paneles A, B y C) ó 0,7 mM (panel D). En cada panel se indican las concentraciones de  $Mg^{2+}$  libre antes y después de la adición de AMP-PNP.



Tiempo (s)

Fluorescencia (u.a.)

1,0 mM a 0,5 mM e indujo una liberación rápida y transitoria de calcio que finalizó a los 129,5 s. En estas condiciones no se observó un patrón oscilatorio de liberación de calcio en todo el tiempo que duró el registro. En general, el comportamiento de liberación oscilatorio producido por AMP-PNP fue inhibido con  $[Mg^{2+}]$  libre  $\geq 0,5$  mM y  $\leq 0,1$  mM y tuvo una frecuencia mucho más baja que la observada con cafeína.

#### **I. 4. Oscilaciones espontáneas de liberación de calcio**

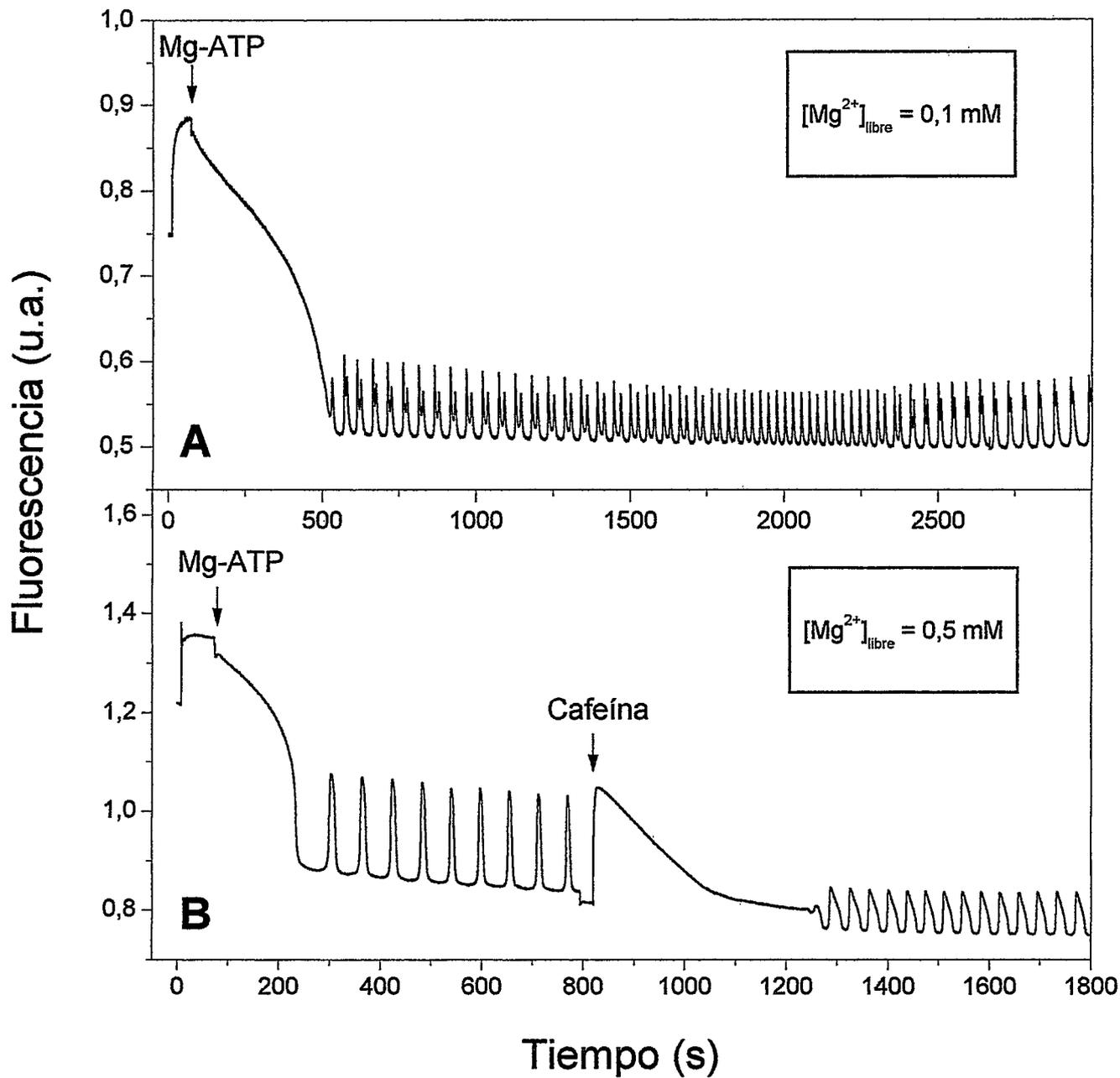
Como se muestra en la Figura 6A, las vesículas acumularon activamente el calcio luego de la adición de Mg-ATP 0,26 mM ( $[Mg^{2+}]$  libre = 0,1 mM) hasta un nivel de  $[Ca^{2+}]$  libre extravesicular de 0,1  $\mu$ M. Posteriormente, se produjeron liberaciones espontáneas de calcio elevando  $[Ca^{2+}]$  libre extravesicular hasta 1-2  $\mu$ M con una frecuencia inicial de 1,2 oscilaciones/minuto, la que luego aumentó a 2,2 oscilaciones/minuto para finalmente retornar a la frecuencia inicial. Este patrón oscilatorio de liberación espontánea se observó sólo en algunas preparaciones y en  $[Mg^{2+}]$  libre entre 0,1 y 0,5 mM.

En la Figura 6B se muestra que luego de la adición de Mg-ATP 1,31 mM ( $[Mg^{2+}]$  libre = 0,5 mM) las vesículas acumularon calcio bajando la  $[Ca^{2+}]$  libre extravesicular hasta 0,1  $\mu$ M y luego se produjeron las oscilaciones espontáneas con una frecuencia de 1,04/minuto. La adición de cafeína entre las oscilaciones produjo un primer evento de liberación de duración diez veces mayor que los eventos de liberación espontánea previos. Este primer episodio de liberación inducido por cafeína fue seguido por oscilaciones con una amplitud menor pero de mayor frecuencia (1,4/minuto) que las observadas antes de la adición de cafeína.

**FIGURA 6.**

**Liberaciones espontáneas de calcio con un patrón oscilatorio.**

La captación de calcio se inició con la adición de Mg-ATP 0,26 mM (panel A) o Mg-ATP 1,31 mM (panel B) y los cambios de  $[Ca^{2+}]$  libre extravésicular se midieron con Calcium Green-2. En los paneles se indica  $[Mg^{2+}]$  libre de cada experimento. **Panel B:** Se indujo liberación de calcio con cafeína 3,8 mM en el tiempo indicado por la flecha.



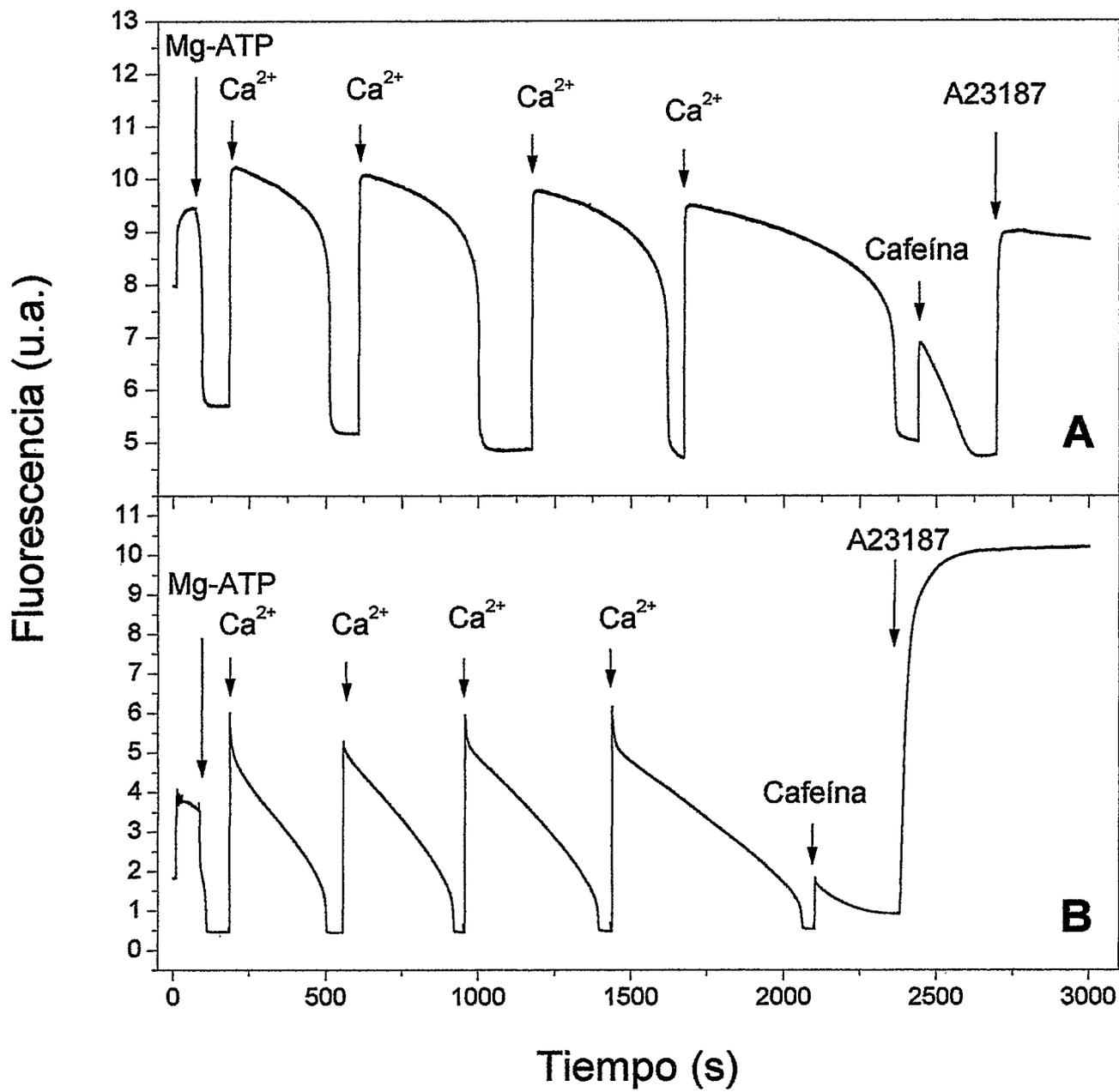
### **I. 5. El aumento del contenido de calcio luminal no anula el comportamiento oscilatorio de las vesículas.**

Para probar si la disminución del contenido de calcio luminal que ocurre durante la liberación de calcio fue responsable de la respuesta transitoria y oscilatoria del canal, las vesículas de RS se cargaron con calcio por sucesivas adiciones de  $\text{CaCl}_2$ . En los experimentos ilustrados en la Figura 7, las vesículas se cargaron activamente con calcio por la adición de Mg-ATP 0,26 mM ( $[\text{Mg}^{2+}]$  libre = 0,1 mM). Luego que  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre extravascular bajó a 0,2  $\mu\text{M}$ , se agregó  $\text{CaCl}_2$  en alícuotas sucesivas de 125 nmoles cada una. Los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre extravascular se midieron con Calcium Green-2 (Figura 7A) o con Fluo-5N (Figura 7B). Después de cada adición de calcio, las vesículas acumularon todo el calcio agregado y  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre externa bajó a 0,1-0,2  $\mu\text{M}$ . Luego de cuatro adiciones, las vesículas acumularon 1000 nmoles de calcio por mg de proteína. La adición de cafeína a estas vesículas cargadas con un alto nivel de calcio indujo un evento transitorio de liberación de calcio que aumentó la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre extravascular a 10  $\mu\text{M}$ ; es decir, que la cafeína liberó sólo 50 nmoles de calcio por mg de proteína, una mínima fracción del contenido total de calcio vesicular. La posterior adición del ionóforo de calcio A23187 produjo una masiva liberación del calcio, que fue más evidente cuando se usó Fluo 5N, confirmando que las vesículas realmente habían acumulado grandes cantidades de calcio. En una serie similar de experimentos las vesículas se cargaron con Mg-ATP 1,31 mM ( $[\text{Mg}^{2+}]$  libre = 0,5 mM) en presencia de Calcium Green-2 (Figura 8A) o de Fluo 5N (Figura 8B). Luego de la adición de dos alícuotas sucesivas de 125 nmoles de  $\text{CaCl}_2$ , las vesículas acumularon 500 nmoles de calcio por mg de proteína. La adición de cafeína produjo un primer evento transitorio de liberación de calcio que fue

### **FIGURA 7.**

#### **Efecto del aumento del contenido de calcio luminal en la liberación de calcio inducida por cafeína.**

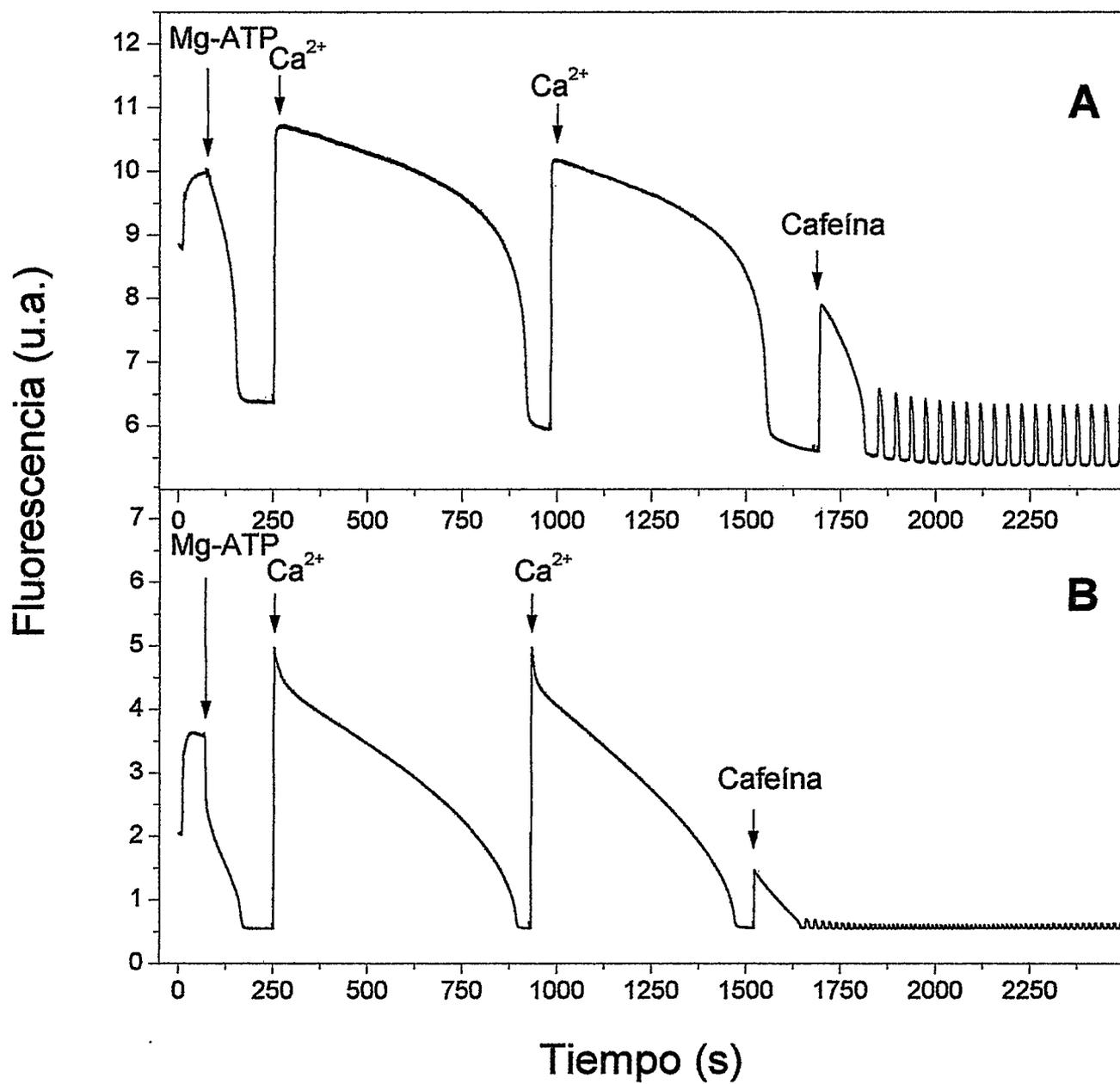
Los cambios de  $[Ca^{2+}]$  libre extravesicular se midieron con Calcium Green-2 (panel A) o con Fluo 5N (panel B). A vesículas activamente cargadas con calcio ( $[Mg^{2+}]$  libre = 0,1 mM;  $[Mg-ATP]$  = 0,26 mM) se agregó  $CaCl_2$  en 4 alícuotas sucesivas de 125 nmoles cada una. En los tiempos indicados por las flechas se agregó cafeína 3,8 mM y A23187 1,9  $\mu$ M.



**FIGURA 8.**

**Efecto del aumento del contenido de calcio luminal en las oscilaciones de calcio inducidas por cafeína.**

Los cambios de  $[Ca^{2+}]$  libre extravesicular se midieron con Calcium Green-2 (panel A) o con Fluo 5N (panel B). A vesículas activamente cargadas con calcio ( $[Mg^{2+}]$  libre = 0,5 mM;  $[Mg-ATP]$  = 1,31 mM) se agregó  $CaCl_2$  en 2 alícuotas sucesivas de 125 nmoles cada una. En los tiempos indicados por las flechas se agregó cafeína 3,8 mM.



seguido por oscilaciones de menor amplitud. Estos resultados muestran que las vesículas muy cargadas con calcio también tienen la respuesta oscilatoria observada en vesículas con contenidos más bajos de calcio luminal. Además, indican que ni el primer evento transitorio de liberación inducido por cafeína, ni la subsecuente respuesta oscilatoria observada en la continua presencia de cafeína, pueden ser atribuidos a la disminución del contenido luminal de calcio del RS.

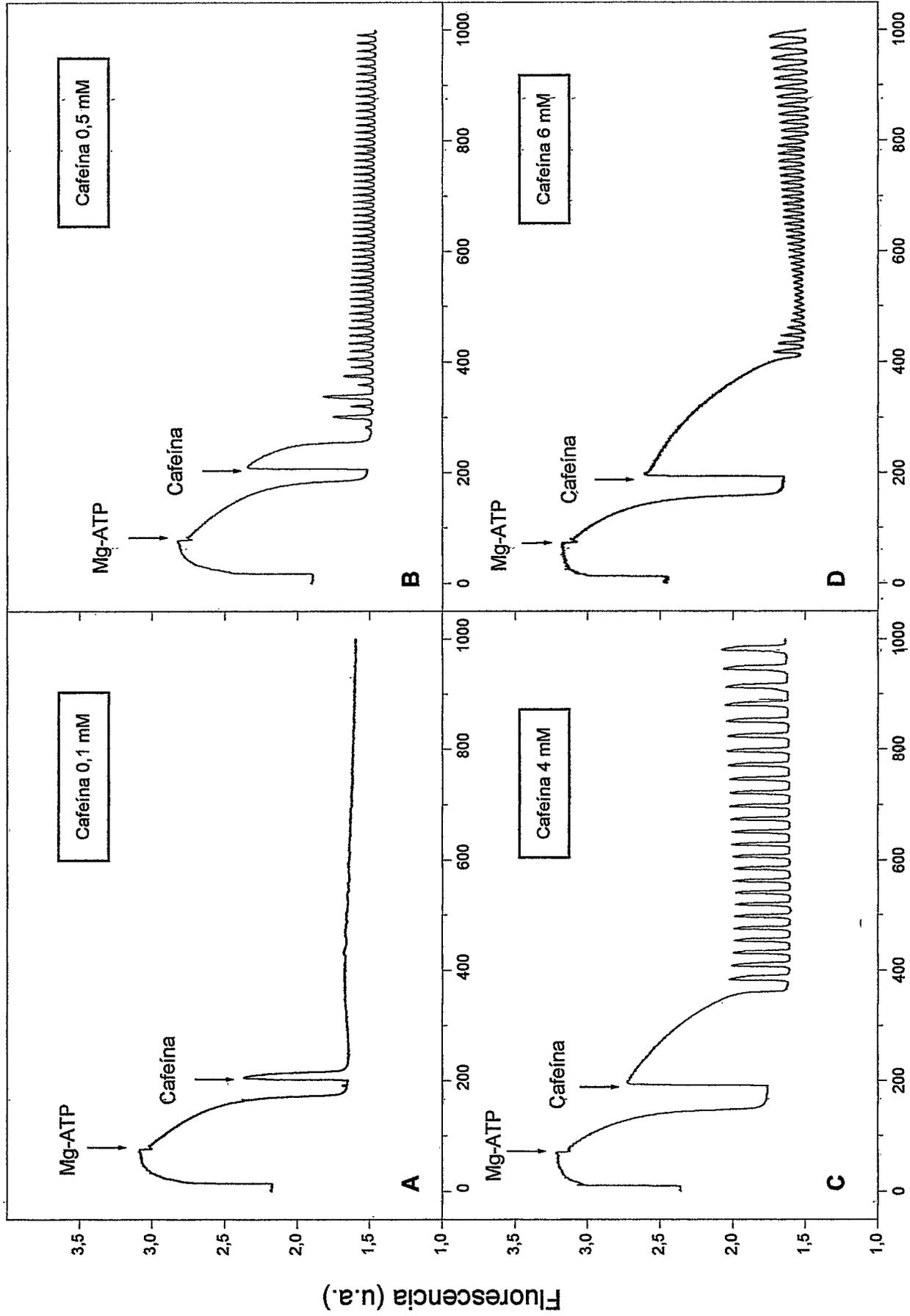
### **I. 6. Efectos de la concentración de cafeína en la liberación de calcio**

Se realizaron una serie de experimentos utilizando diferentes concentraciones de cafeína y concentraciones constantes de Mg-ATP y  $Mg^{2+}$  libre ( $[Mg-ATP] = 1,31$  mM y  $[Mg^{2+}]$  libre = 0,5 mM). En los experimentos ilustrados en la Figura 9, luego de la adición de Mg-ATP las vesículas captaron calcio con una velocidad promedio de 74,7 nmol/(mg x min) hasta que  $[Ca^{2+}]$  extravésicular disminuyó a 0,21  $\mu$ M. La adición de 0,1 mM de cafeína (Figura 9A) produjo un primer evento de liberación pequeño que finalizó en unos pocos segundos ( $T_L = 9,5$  s), sin oscilaciones posteriores. Un comportamiento similar se observó luego de la adición de 0,25 mM de cafeína (datos no mostrados). Al aumentar la concentración de cafeína a 0,5 mM se produjo un primer evento de liberación de mayor duración, seguido por oscilaciones (Figura 9B). Una concentración de cafeína de 4 mM produjo un primer evento de liberación de mayor amplitud y mayor duración que fue seguido por oscilaciones regulares (Figura 9C). Con la adición de cafeína 6 mM, aumentó moderadamente el valor de  $T_L$  y produjo un patrón oscilatorio irregular (Figura 9D). Al aumentar la cafeína a 8 mM se produjo una respuesta similar a la observada con cafeína 6 mM pero con un  $T_L$  un poco mayor

**FIGURA 9.**

**Efecto del aumento de la concentración de cafeína en la liberación de calcio inducida por cafeína.**

Todos los experimentos se realizaron en  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre = 0,5 mM y  $[\text{Mg-ATP}] = 1,31$  mM. En cada panel se señala la concentración de cafeína que se agregó en los tiempos indicados por las flechas. Los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre extravesicular se midieron con Calcium Green-2.



Tiempo (s)

seguido de oscilaciones irregulares (datos no mostrados). Con concentraciones aun mayores de cafeína (12 y 16 mM)  $T_L$  aumentó aun más y no se observaron oscilaciones (datos no mostrados).

La cafeína a una concentración de 6 mM ya inhibe la bomba de calcio del RS (Allen y Westerblad, 1995), lo que podría afectar el valor de  $T_L$ . Considerando el intervalo de concentraciones entre 0,1 y 6 mM, el incremento de la concentración de cafeína aumentó el  $T_L$ , como se muestra en la Figura 10, modificó el comportamiento oscilatorio y también aumentó la cantidad neta de calcio liberada. Se observó una respuesta similar en tres distintas preparaciones probadas.

### **I. 7. Cinética de la liberación de calcio inducida por cafeína**

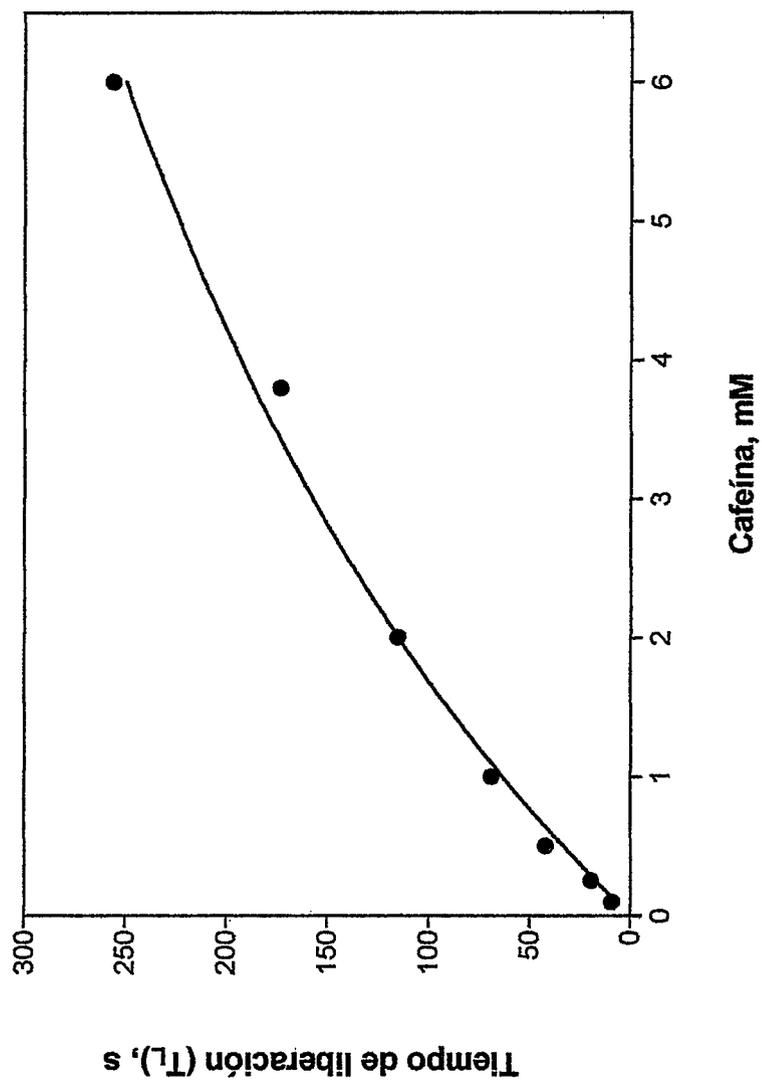
Para determinar las velocidades iniciales de la liberación de calcio inducida por cafeína, se realizaron experimentos en un fluorímetro de flujo detenido. Con este fluorímetro es posible medir los cambios de fluorescencia en tiempos de milisegundos y también en tiempos largos (segundos a minutos).

En esta serie de experimentos se indujo la liberación de calcio con distintas concentraciones de cafeína a distintas  $[Mg^{2+}]$  libre, mezclando las vesículas activamente cargadas en presencia de Mg-ATP con la solución de liberación que contenía cafeína. En las Figuras 11A a 11H se muestran registros de experimentos que fueron colectados a diferentes tiempos luego de la mezcla inicial. La liberación de calcio fue inducida mezclando 10:1 las vesículas cargadas con calcio en la solución I (ver Tabla 1) con la solución de liberación que contenía cafeína (solución II). Luego de la mezcla, la solución extraventricular comprendía  $[Mg^{2+}]$  libre 0,5 mM, cafeína 3,8 mM en Mops-Tris

**FIGURA 10.**

**Efecto de la concentración de cafeína sobre el tiempo de liberación de calcio ( $T_L$ ).**

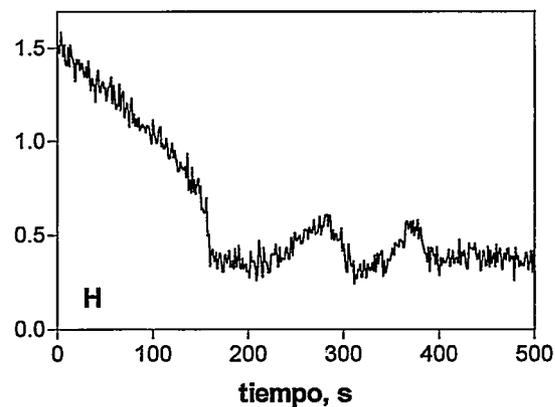
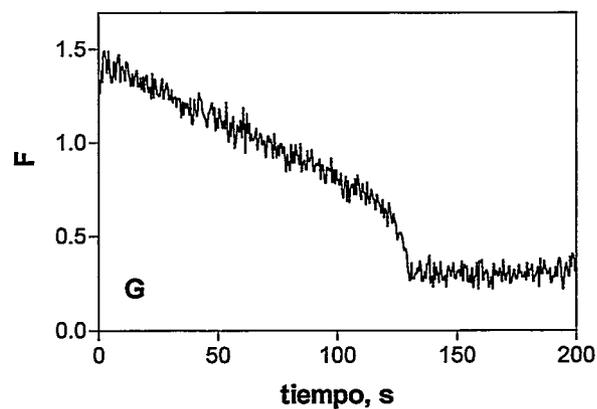
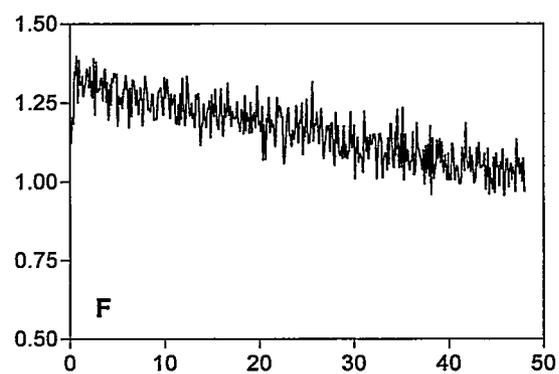
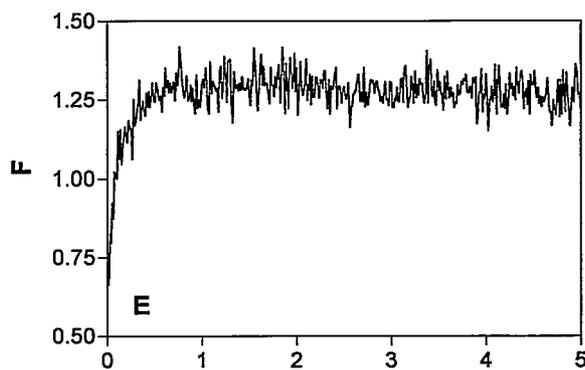
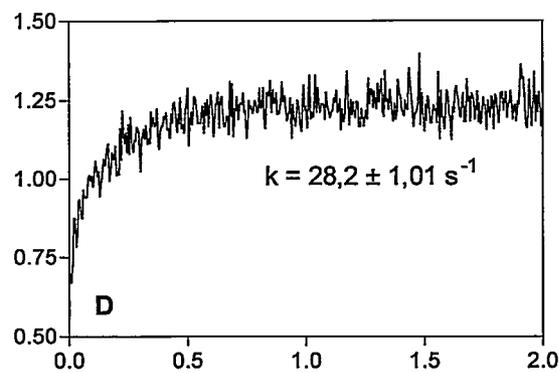
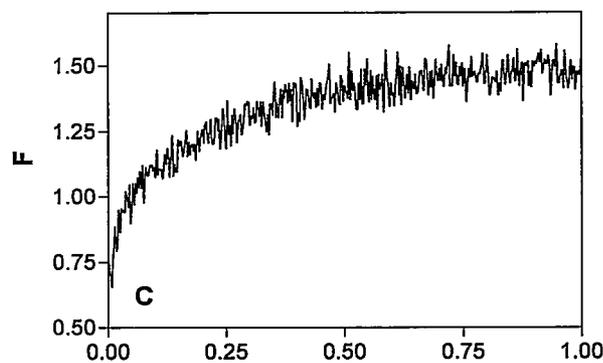
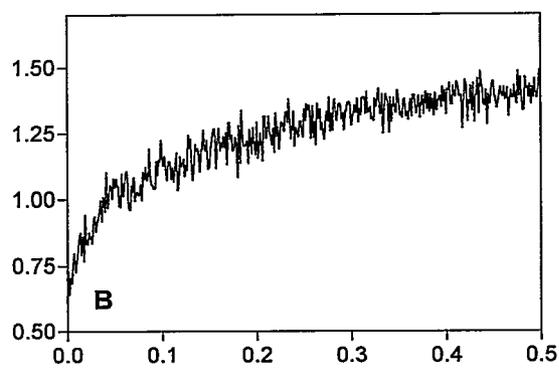
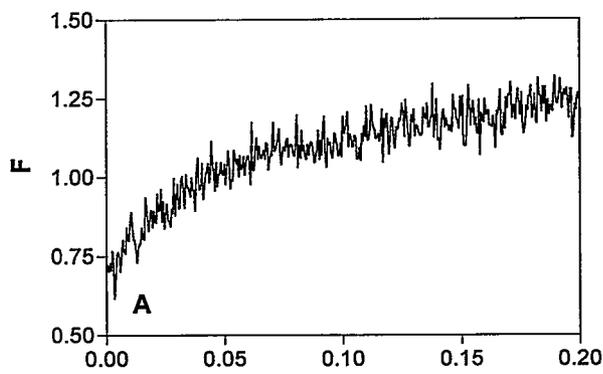
Los datos se tomaron de experimentos realizados de acuerdo a los indicados en la Figura 9. Estos valores se ajustaron a una función hiperbólica ( $Y = T_{\text{máx}} * X / (K_d + X)$ ) lo que predice una duración máxima del tiempo de liberación de 604,9 s y una concentración de cafeína de 8,5 mM para alcanzar la mitad del tiempo máximo.



### **FIGURA 11.**

#### **Registros cinéticos de la liberación de calcio inducida por cafeína obtenidos desde un espectrofluorímetro de flujo detenido.**

Los registros (A a H) se obtuvieron mezclando 10:1 la solución I (que contenía vesículas de RS 0,2 mg/mL,  $Mg^{2+}$  libre 0,5 mM) con la solución II (que contenía cafeína 41,8 mM;  $Mg^{2+}$  libre 0,5 mM) y se registraron durante distintos tiempos. Las vesículas presentes en la solución I se cargaron activamente con calcio durante 3 minutos antes de comenzar cada experimento. El cambio de  $[Ca^{2+}]$  libre del medio extravésicular se midió con Calcium Green-2 presente en la solución I. Se calculó la constante de velocidad de liberación de calcio en el transcurso de la liberación inicial de calcio, antes que comience a disminuir la señal. El aumento de la señal de fluorescencia en el panel D se ajustó a una exponencial simple dando un valor de  $k = 28,2 \pm 1,01 \text{ s}^{-1}$ . Al ajustar esta señal de fluorescencia a los 500 milisegundos (panel B) o al segundo (panel C) de iniciada la liberación de calcio, se obtuvo el mismo valor de  $k$ .



20 mM, pH 7,2, pCa 6,7. El cambio de la señal de calcio fue medido con Calcium Green-2 presente en el medio extravesicular. En las Figuras 11A a 11E se observa el rápido aumento de la fluorescencia que indica la rápida liberación del calcio acumulado en las vesículas inducida por cafeína. Esta liberación rápida dura por lo menos 5 segundos (ver Figuras 11E y 11F) antes de que comience a disminuir el calcio extravesicular producto de la disminución de la liberación de calcio mientras persiste la captación. A los 130 s ya se ha completado el primer evento de liberación como lo muestra la Figura 11G y luego suceden las oscilaciones espontáneas de liberación de calcio (Figura 11H), las que tienen una duración promedio de 74 s.

En este experimento, a los 2 segundos de iniciada la liberación de calcio (panel D), el aumento de la señal de fluorescencia se ajustó a una exponencial simple dando un valor de  $k = 28,2 \pm 1,01 \text{ s}^{-1}$ . Al ajustar esta señal de fluorescencia a los 500 milisegundos (panel B) o al segundo (panel C) de iniciada la liberación de calcio, se obtuvo el mismo valor de  $k$ .

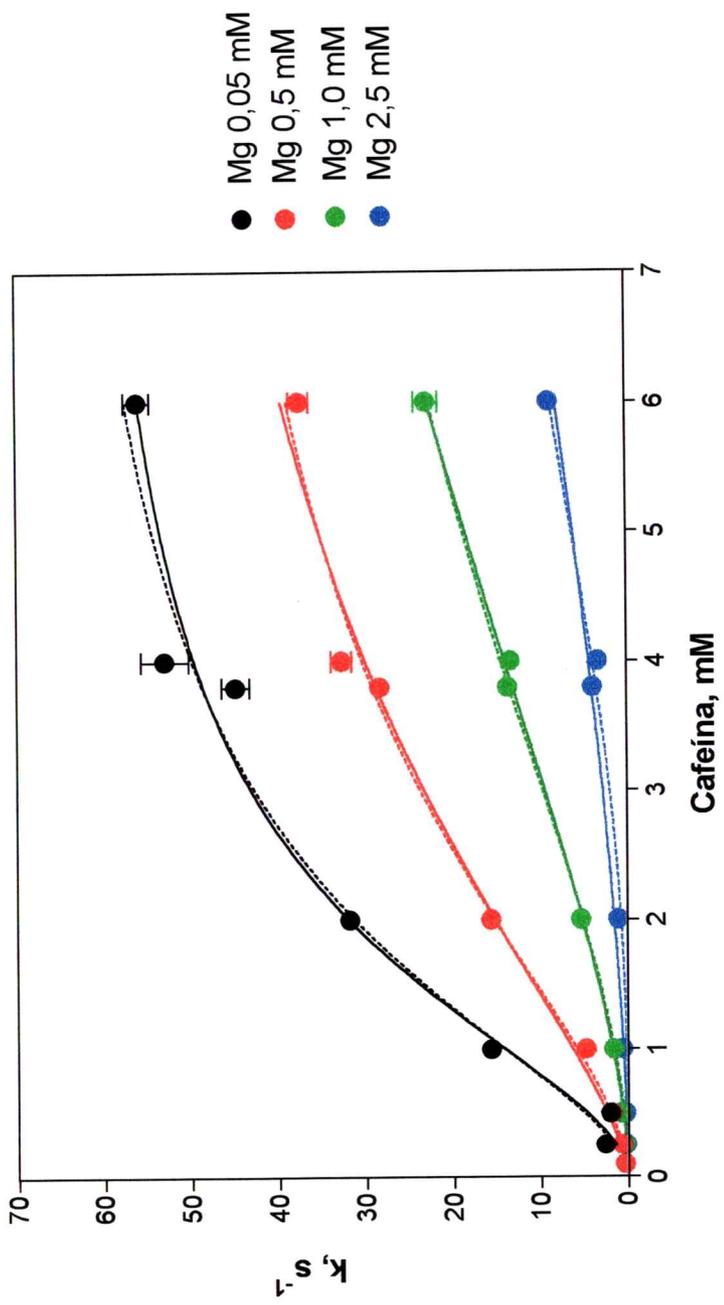
En la Figura 12 se muestra el efecto de varias  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre sobre la liberación de calcio inducida por distintas concentraciones de cafeína. En cada experimento se calculó el valor de la constante de velocidad de liberación ( $k$ ) según se indicó anteriormente. En todas las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  libre probadas, al aumentar la concentración de cafeína aumentó el valor de  $k$ . Esta constante de liberación también fue dependiente de  $[\text{Mg}^{2+}]$ .

Cada serie de datos se ajustó a una función de Hill de dos maneras: (a) dejando todas las incógnitas libres ( $K_{0,5}$ ,  $n_{\text{Hill}}$ ,  $k_{\text{máx}}$ ) (Figura 12, líneas discontinuas), o (b) fijando el valor de  $k_{\text{máx}}$  (Figura 12, líneas continuas) al valor que resulta de ajustar los datos de

**FIGURA 12:**

**Efecto de  $[Mg^{2+}]$  libre sobre las constantes de velocidad de liberación de calcio inducida por concentraciones crecientes de cafeína.**

Los datos se tomaron de experimentos similares a los mostrados en la Figura 11 variando la concentración de cafeína y de  $Mg^{2+}$  libre. *Círculos negros:*  $[Mg^{2+}]$  libre = 0,05 mM; *Círculos rojos:*  $[Mg^{2+}]$  libre = 0,5 mM; *Círculos verdes:*  $[Mg^{2+}]$  libre = 1,0 mM; *Círculos azules:*  $[Mg^{2+}]$  libre = 2,5 mM. Cada punto del gráfico corresponde al valor de k de 8 a 10 registros promediados, y las barras indican los respectivos errores estándares. Para  $[Mg^{2+}]$  libre = 2,5 mM, el error estandar es más pequeño que el tamaño de los símbolos. Los datos de cada  $[Mg^{2+}]$  se ajustaron a una función de Hill de dos maneras: (a) dejando todas las incógnitas libres ( $K_{0,5}$ ,  $n_{Hill}$ ,  $k_{máx}$ ) (líneas discontinuas), o (b) fijando el  $k_{máx}$  al valor obtenido en  $Mg^{2+}$  0,05 mM según el ajuste (a) (líneas continuas).



[Mg<sup>2+</sup>] libre 0,05 mM según el ajuste (a). En la Figura 13 se grafican los resultados de ambos ajustes y se resumen en la Tabla 4. Cuando se utilizó el método de ajuste (a), a medida que incrementa [Mg<sup>2+</sup>] libre, la constante de Hill para cafeína ( $K_{0,5}$ ) aumentó moderadamente ( $2,2 \pm 0,2$  mM en [Mg<sup>2+</sup>] libre 0,05 mM a  $6,4 \pm 0,4$  mM en [Mg<sup>2+</sup>] libre 2,5 mM) (cuadrados vacíos rojos). El valor del  $n_{Hill}$  se mantuvo relativamente constante (1,7 a 1,9) entre [Mg<sup>2+</sup>] libre 0,05 mM y 1,0 mM y aumentó a  $2,9 \pm 0,3$  en [Mg<sup>2+</sup>] libre 2,5 mM (cuadrados vacíos azules).

Al utilizar el método (b), fijando el valor de  $k_{m\acute{a}x}$  a  $67,9 \text{ s}^{-1}$  para cada serie de datos, el  $K_{0,5}$  aumentó significativamente desde  $2,2 \pm 0,2$  mM en [Mg<sup>2+</sup>] libre 0,05 mM a  $30,9 \pm 1,5$  mM en [Mg<sup>2+</sup>] libre 2,5 mM (círculos rojos). El valor de  $n_{Hill}$  se mantuvo prácticamente constante en todo el intervalo de [Mg<sup>2+</sup>] probadas (1,3 - 1,7).

### **I. 8. La oxidación y reducción de las vesículas modifica el tiempo de liberación y el comportamiento oscilatorio inducidos por cafeína.**

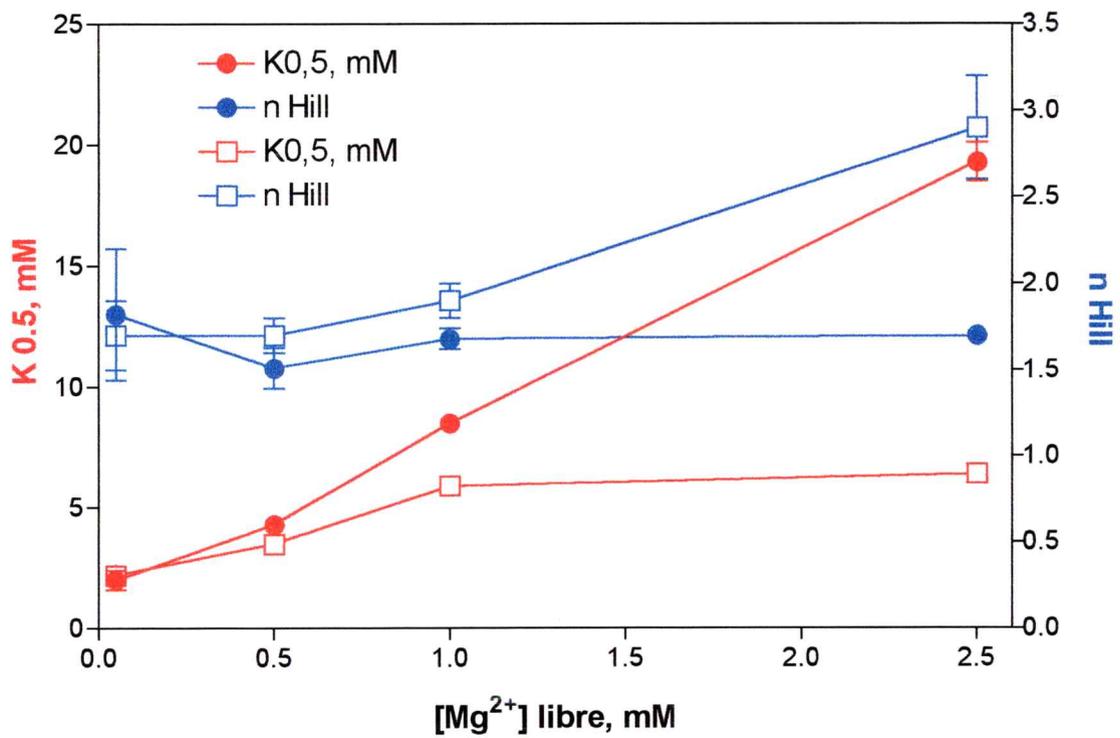
Otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que la incubación de las vesículas de RS con el agente oxidante de grupos sulfhidrilos (SH), timerosal, disminuye el efecto inhibitorio de Mg<sup>2+</sup> sobre la liberación de calcio inducida por calcio (Donoso y cols. 2000). En esta tesis se utilizaron diversos agentes que modifican grupos SH para probar su efecto sobre la respuesta transitoria y oscilatoria inducida por cafeína descrita anteriormente.

Como se muestra en la Figura 14, la liberación inducida por cafeína en la presencia de Mg<sup>2+</sup> libre 0,1 mM fue diferente en vesículas incubadas con glutathion reducido (GSH, un agente reductor de grupos SH) con respecto a las vesículas nativas.

**FIGURA 13:**

**Efecto de  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre sobre el resultado de los ajustes a una función de Hill.**

El resultado de los ajustes a una función de Hill mostrados en la Figura 12 se grafican en función de  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre. *Símbolos vacíos:* Resultados del ajuste (a) que se realizó dejando todas las incógnitas ( $K_{0,5}$ ,  $n_{\text{Hill}}$ ,  $k_{\text{máx}}$ ) libres. *Símbolos llenos:* Resultados del ajuste (b) que se realizó fijando el  $k_{\text{máx}}$  al valor obtenido en  $\text{Mg}^{2+}$  0,05 mM según el ajuste (a). *Símbolos en rojo  $K_{0,5}$  y símbolos en azul  $n_{\text{Hill}}$ .*



**Tabla 4**

**Ajuste de los datos de la Figura 12  
a una función de Hill**

| [Mg <sup>2+</sup> ] libre<br>(mM) | Constante de velocidad<br>máxima |                   | Coeficiente de Hill |                   | Constante de Hill     |                   |
|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
|                                   | k <sub>máx</sub> (s)             |                   | n <sub>Hill</sub>   |                   | K <sub>0,5</sub> (mM) |                   |
|                                   | <i>ajuste (a)</i>                | <i>ajuste (b)</i> | <i>ajuste (a)</i>   | <i>ajuste (b)</i> | <i>ajuste (a)</i>     | <i>ajuste (b)</i> |
| 0,05                              | 67,9 ± 3,7                       | 67,9(*)           | 1,7 ± 0,2           | 1,7               | 2,2 ± 0,2             | 2,2               |
| 0,5                               | 54,3 ± 2,2                       | 67,9(*)           | 1,7 ± 0,1           | 1,3 ± 0,1         | 3,5 ± 0,2             | 5,1 ± 0,3         |
| 1,0                               | 44,3 ± 1,6                       | 67,9(*)           | 1,9 ± 0,1           | 1,3 ± 0,07        | 5,9 ± 0,3             | 11,9 ± 0,6        |
| 2,5                               | 18,8 ± 0,9                       | 67,9(*)           | 2,9 ± 0,3           | 1,4               | 6,4 ± 0,4             | 30,9 ± 1,5        |

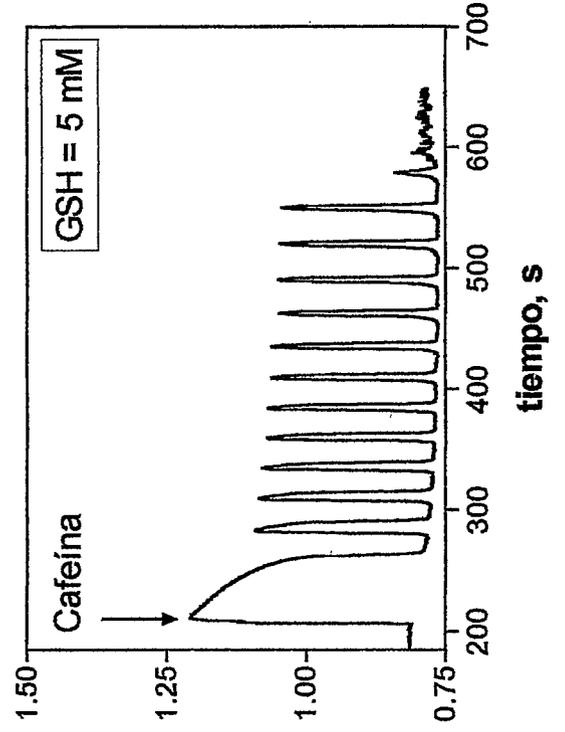
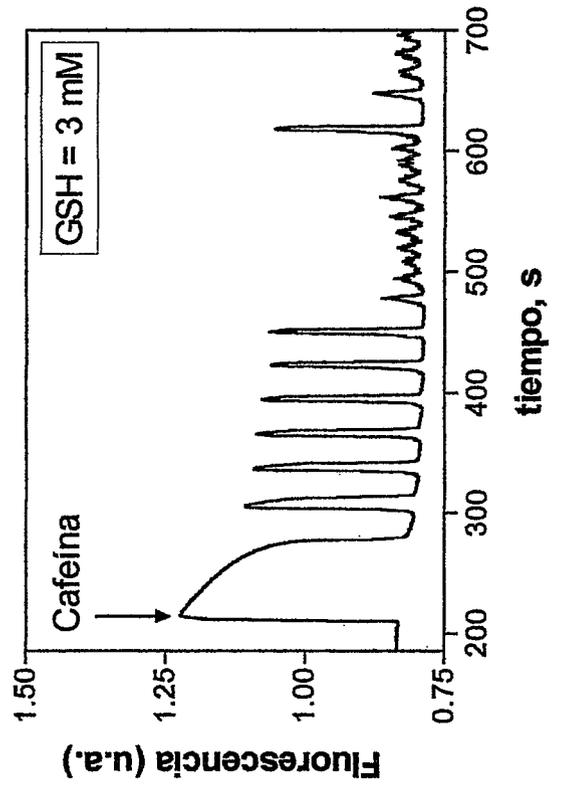
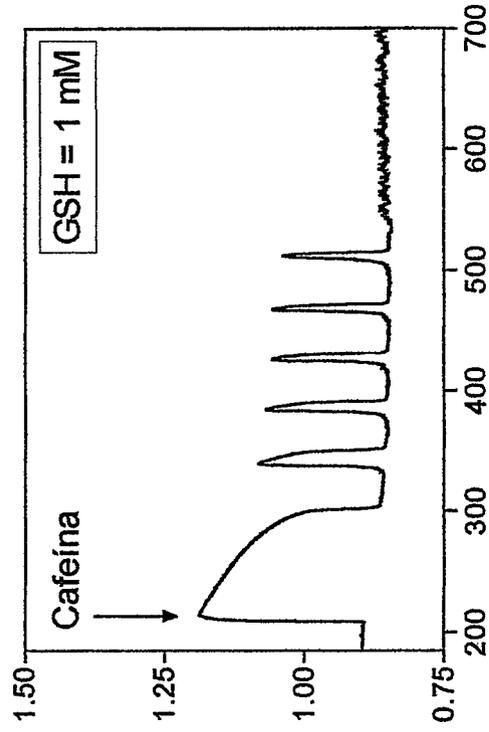
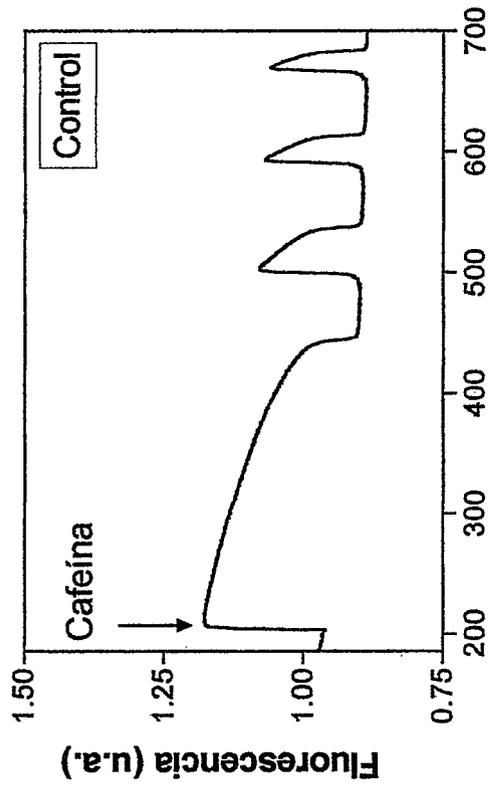
**Ajuste (a)** : Los datos de la figura 12 se ajustaron a una función de Hill dejando todas las incógnitas libres (k<sub>máx</sub>, n<sub>Hill</sub>, K<sub>0,5</sub>).

**Ajuste (b)** : Los datos de la figura 12 se ajustaron a una función de Hill fijando el k<sub>máx</sub> (\*) al valor obtenido según el ajuste (a) en Mg<sup>2+</sup> 0,05mM.

**FIGURA 14.**

**Efecto de glutatión reducido (GSH) en la liberación de calcio inducida por cafeína.**

En todos los experimentos las vesículas se incubaron durante 5 minutos a 37 °C con las concentraciones de GSH indicadas en cada panel o sin GSH (control) y luego se cargaron activamente con calcio por la adición de Mg-ATP 0,26 mM ( $[Mg^{2+}]$  libre = 0,1 mM). En la figura se muestra la subsecuente liberación de calcio inducida con cafeína 3,8 mM en los tiempos señalados por las flechas. El cambio de  $[Ca^{2+}]$  libre extravesicular se midió con Calcium Green-2.



La reducción de las vesículas de RS con GSH 1 mM produjo una marcada disminución de  $T_L$ , desde 230 s a 83 s. La incubación de las vesículas con GSH 3 mM redujo aun más el  $T_L$  a 59,5 s y una incubación con GSH 5 mM disminuyó el tiempo de liberación a 47,5 s. La reducción de las vesículas con GSH también modificó la respuesta oscilatoria. La frecuencia y la amplitud de las oscilaciones aumentó a medida que incrementó la concentración del agente reductor, como se observa en los registros ilustrados en la Figura 14. Las oscilaciones en las vesículas incubadas con GSH duraron sólo entre 400 a 600 segundos (ver Figura 14); en cambio, en las vesículas control las oscilaciones permanecieron hasta por lo menos 50 minutos (datos no mostrados).

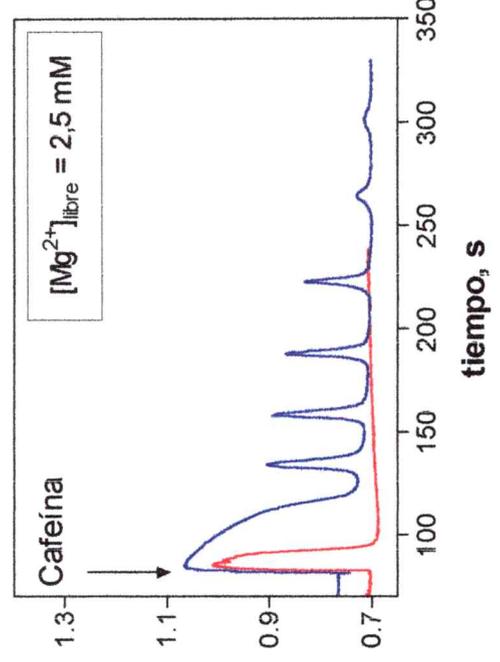
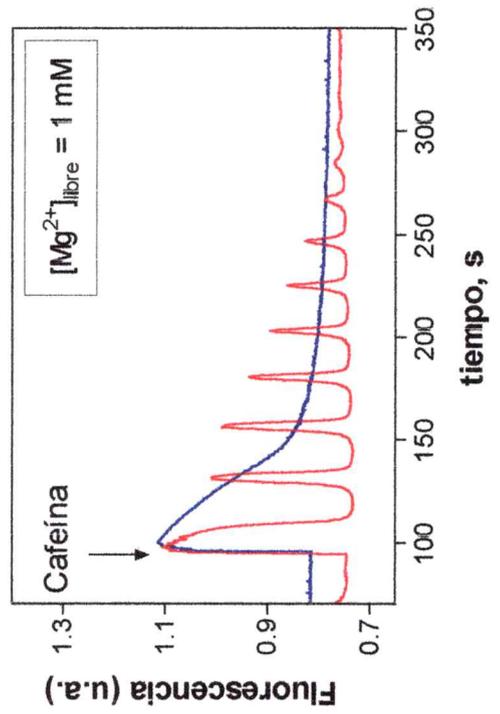
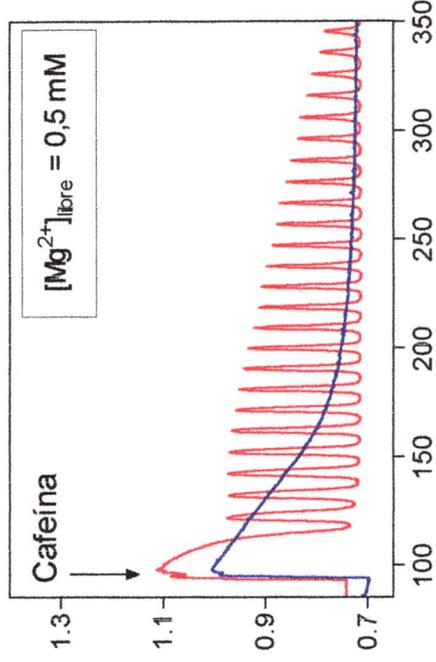
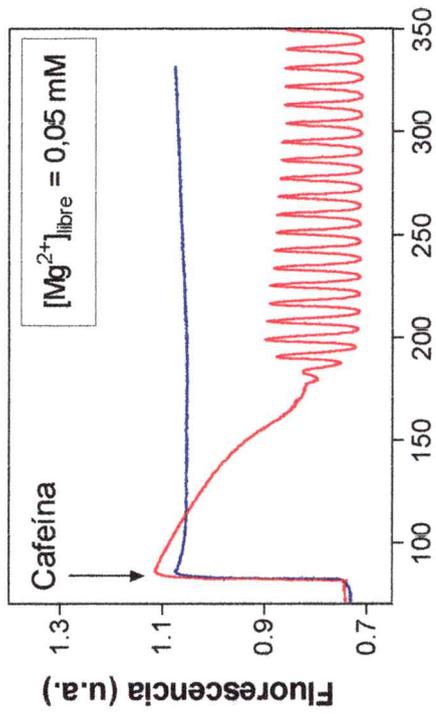
La preincubación de las vesículas con glutatión nitrosilado (GS-NO, un agente oxidante de grupos SH) tuvo un efecto opuesto al de GSH, ya que aumentó  $T_L$ . En los registros mostrados en la Figura 15 se observa que en todas las concentraciones de  $Mg^{2+}$  probadas, la preincubación con GS-NO 100  $\mu$ M (trazos en azul) produjo una liberación de calcio inducida por cafeína con un  $T_L$  mayor comparado con las vesículas preincubadas con GSH 3 mM (trazos en rojo). La oxidación también cambió el patrón oscilatorio que se observó en presencia de GSH. En  $[Mg^{2+}]$  libre 2,5 mM, la oxidación generó una respuesta oscilatoria a cafeína que no se observó cuando las vesículas habían sido previamente reducidas (Figura 15, panel inferior derecho) y tampoco en las vesículas nativas (ver Figura 3D). Por otro lado, en  $[Mg^{2+}]$  libre entre 0,05 mM a 1,0 mM, la oxidación anuló las respuestas oscilatorias que se observaron en condiciones reductoras.

En la Figura 16 se resumen los resultados del efecto de la oxidación y reducción de las vesículas sobre  $T_L$  en distintas  $[Mg^{2+}]$  libre. En  $[Mg^{2+}]$  libre entre 0,05 y 0,5 mM,

**FIGURA 15.**

**Efecto de agentes redox en la liberación de calcio inducida por cafeína en distintas  $[Mg^{2+}]$  libre.**

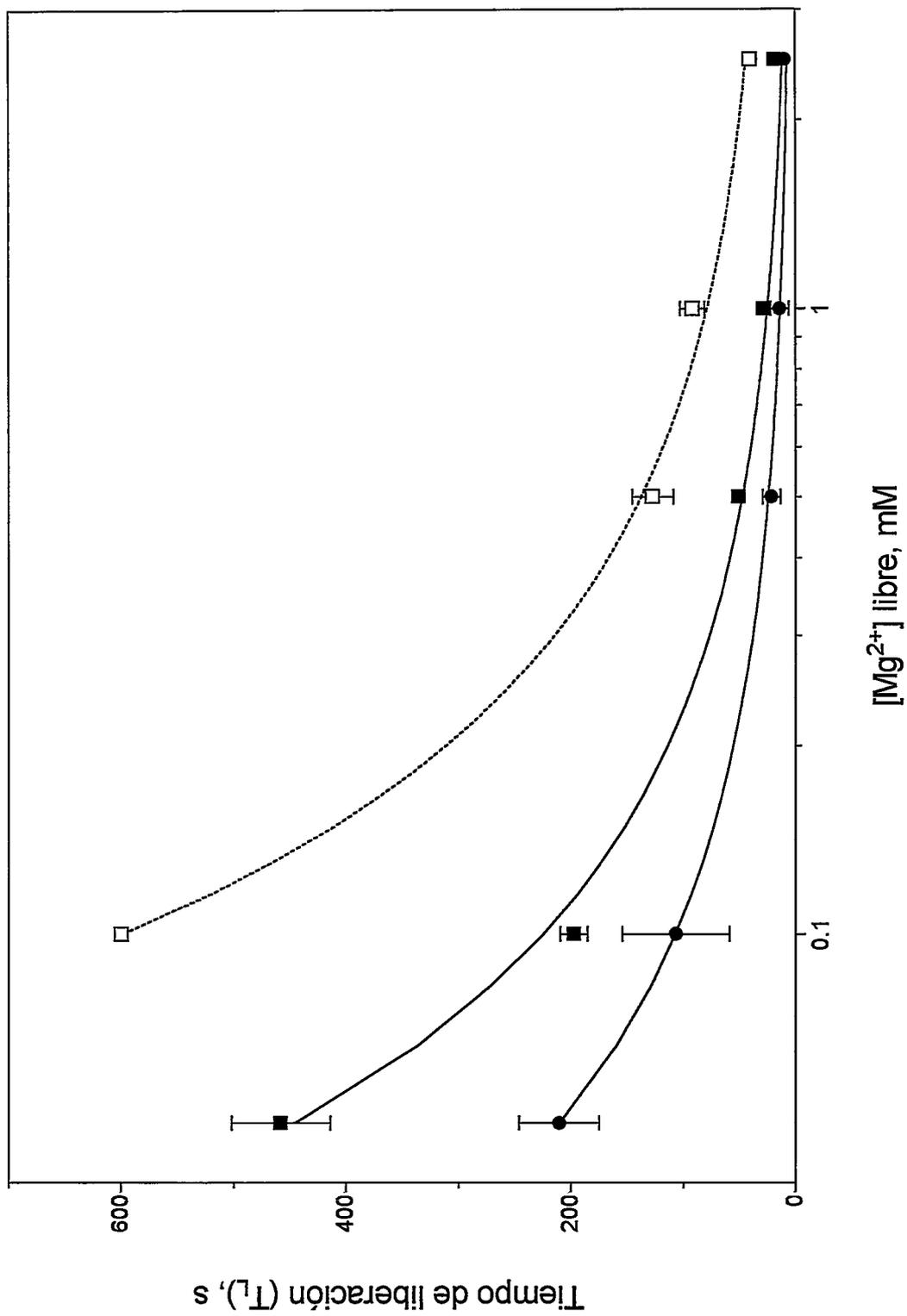
Las vesículas se incubaron durante 5 minutos a 37 °C con GSH 3 mM (glutación reducido, trazos en rojo) o con GS-NO 100  $\mu$ M (glutacion nitrosilado, trazos en azul) y se cargaron activamente con calcio agregando distintas concentraciones de Mg-ATP ( $[Mg^{2+}]$  libre indicadas en cada panel; ver Tabla 2 para la respectiva  $[Mg-ATP]$ ). En la figura se muestra la posterior liberación de calcio inducida con cafeína 3,8 mM. El cambio de  $[Ca^{2+}]$  libre extravésicular se midió con Calcium Green-2.



**FIGURA 16.**

**Efecto de  $[Mg^{2+}]$  libre sobre el tiempo de liberación ( $T_L$ ) inducido por cafeína en distintos estados redox de las vesículas.**

Los datos se tomaron de experimentos como los ilustrados en las Figuras 3 y 15. Para cada  $[Mg^{2+}]$  libre se midió la duración del primer evento de liberación inducido por cafeína 3,8 mM en vesículas nativas (cuadrados llenos) y en vesículas incubadas por 5 minutos a 37 °C con GS-NO 100  $\mu$ M (cuadrados vacíos) o con GSH 3 mM (círculos llenos).



las vesículas reducidas con GSH 3 mM mostraron valores de  $T_L$  menores (círculos llenos) que los de las vesículas nativas (cuadrados llenos). La oxidación de las vesículas con GS-NO 100  $\mu$ M aumentó notoriamente el  $T_L$  comparado con las vesículas nativas y con las vesículas reducidas en todas las concentraciones de  $Mg^{2+}$  ensayadas (cuadrados vacíos).

El efecto de la oxidación de las vesículas sobre  $T_L$  fue dependiente de la concentración del agente oxidante. En la Figura 17 se muestra que en vesículas preincubadas con concentraciones crecientes de timerosal (agente oxidante de grupos SH) en presencia de  $[Mg^{2+}]$  libre 1,27 mM, aumentó la duración del primer evento de liberación inducido por cafeína. Los valores de  $T_L$  aumentaron linealmente con la concentración de timerosal, como se muestra en el inserto de la Figura 17. La velocidad de captación de la bomba sólo cambió con la concentración más alta del agente oxidante (timerosal 10  $\mu$ M), disminuyendo notoriamente. Esto se visualiza por el aumento de la pendiente de la curva en azul luego de la adición de Mg-ATP (Figura 17).

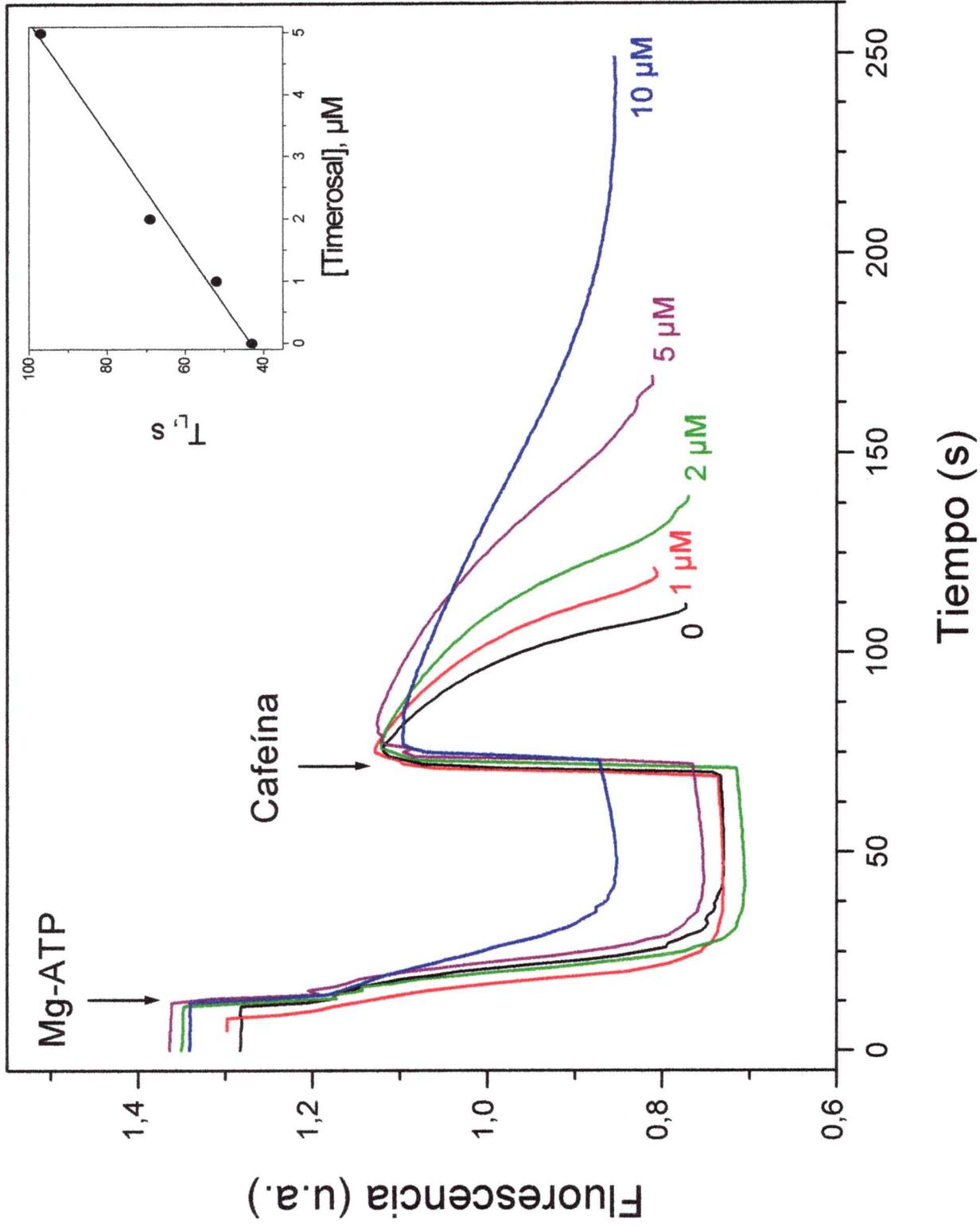
En la Figura 18 se muestra que en presencia de  $[Mg^{2+}]$  libre 1,27 mM, también aumentó el  $T_L$  a medida que aumentó la concentración de otro agente oxidante (GS-NO). Similarmente a lo observado con timerosal, la velocidad de captación de la bomba no cambió con concentraciones bajas de GS-NO ( $\leq 100 \mu$ M) y sólo disminuyó con GS-NO 500  $\mu$ M (datos no mostrados).

El efecto de la oxidación fue reversible. En el experimento ilustrado en la Figura 19, en  $[Mg^{2+}]$  libre 0,1 mM las vesículas fueron incubadas por 5 minutos con timerosal 5  $\mu$ M, lo que produjo un  $T_L$  de 579,5 s (trazo en azul). En otro experimento, vesículas preincubadas con timerosal fueron subsecuentemente incubadas con GSH 5 mM por 15

**FIGURA 17.**

**Efecto de la incubación de las vesículas con concentraciones crecientes de timerosal en la liberación de calcio inducida por cafeína.**

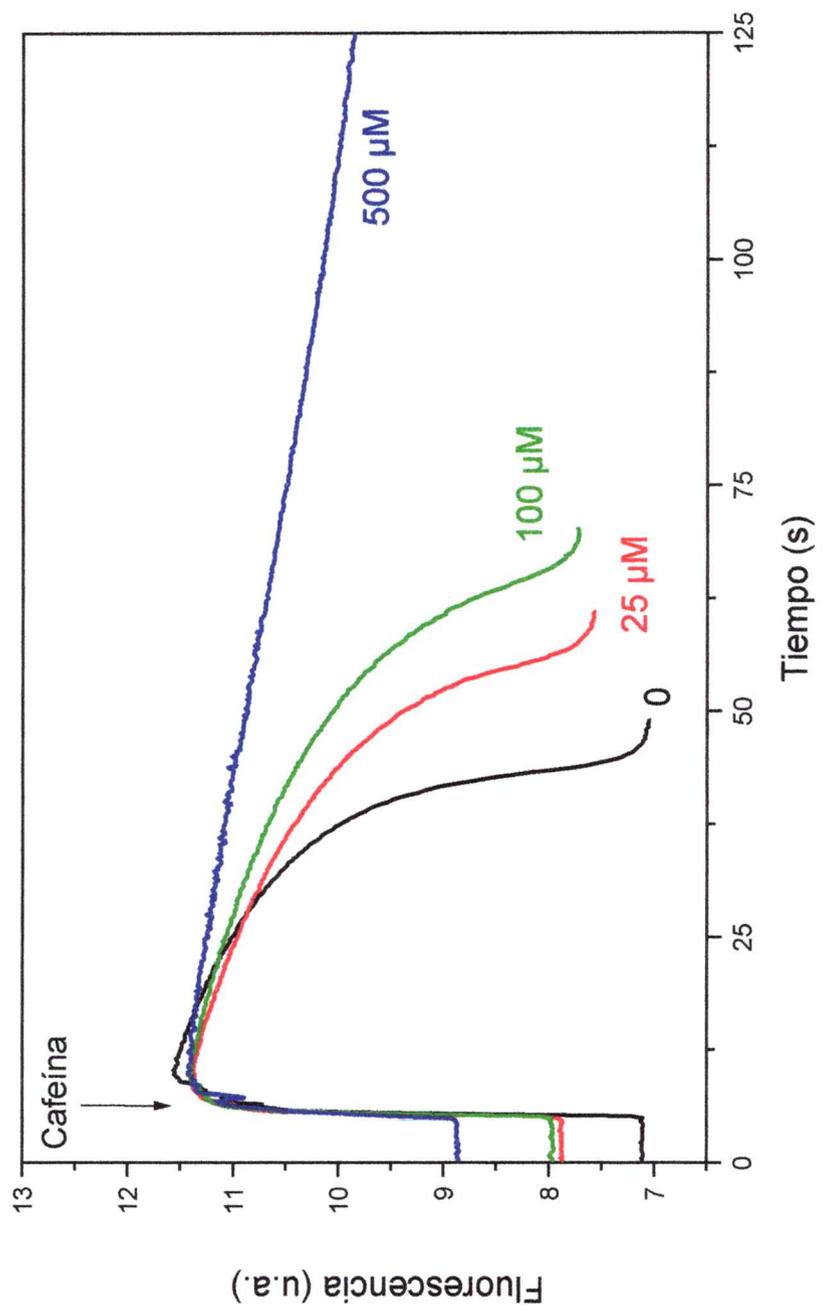
Las vesículas de RS se incubaron por 5 minutos a 37 °C con las concentraciones indicadas de timerosal. Luego, se cargaron activamente con calcio con la adición de Mg-ATP 4,72 mM ( $[Mg^{2+}]$  libre = 1,27 mM). La liberación de calcio se indujo con la adición de cafeína 3,8 mM. En el inserto se grafica el efecto de concentraciones crecientes de timerosal sobre el tiempo de liberación de calcio ( $T_L$ ) inducido por cafeína.



**FIGURA 18.**

**Efecto de la incubación de las vesículas con concentraciones crecientes de GS-NO en la liberación de calcio inducida por cafeína.**

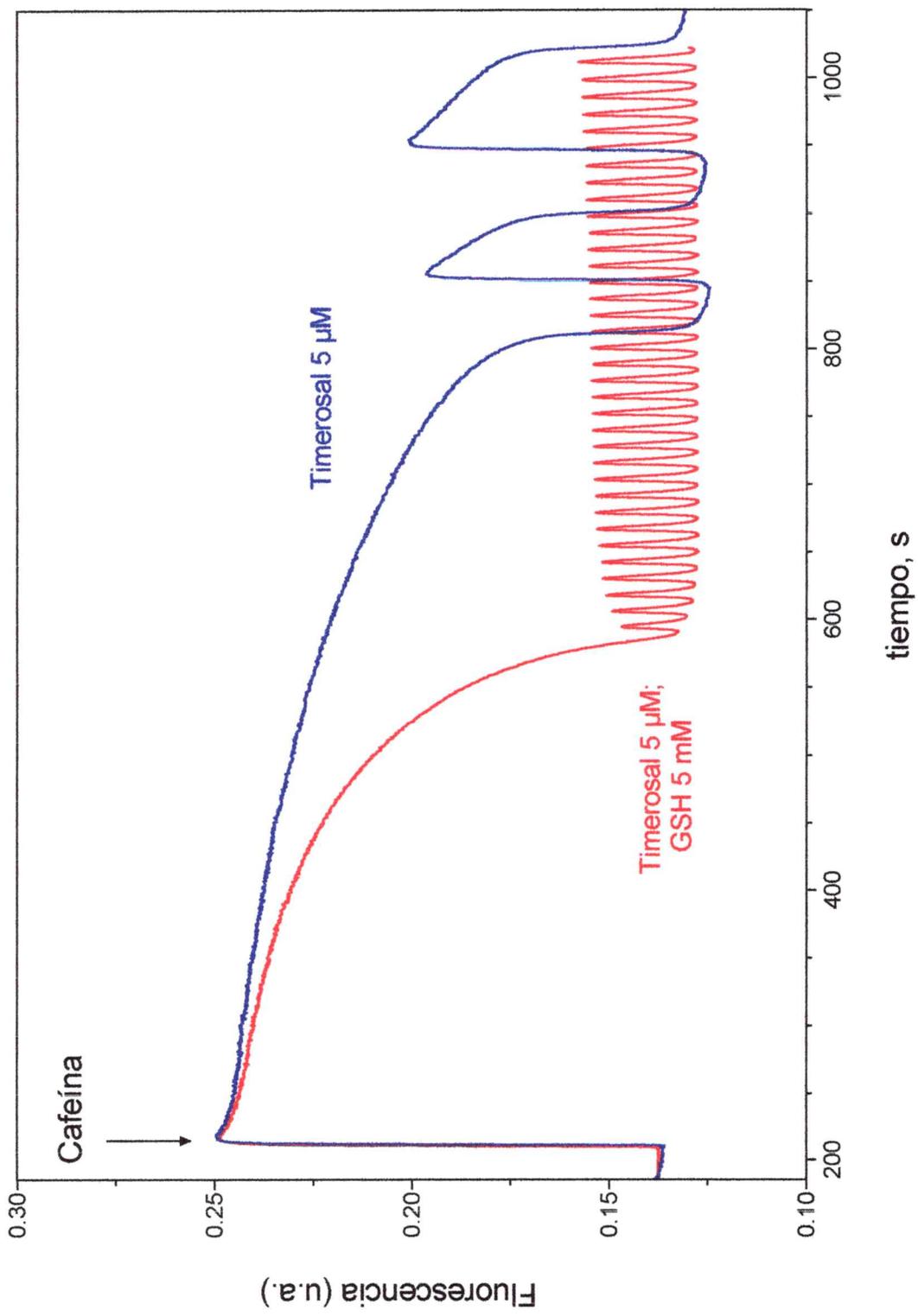
Las vesículas de RS se incubaron por 5 minutos a 37 °C con las concentraciones indicadas de GS-NO. Luego se cargaron activamente con calcio con la adición de Mg-ATP 4,72 mM ( $[Mg^{2+}]$  libre = 1,27 mM). En la figura se muestra el primer evento de liberación de calcio inducido por la subsecuente adición de cafeína 3,8 mM.



**FIGURA 19.**

**Reversión del efecto de timerosal en la liberación de calcio inducida por cafeína, por incubación con GSH.**

*Trazo en azul:* Las vesículas de RS se incubaron por 5 minutos a 28 °C con timerosal 5  $\mu$ M y se cargaron con calcio por la adición de Mg-ATP 0,26 mM ( $[Mg^{2+}]$  libre = 0,1 mM). Luego de la captación se indujo la liberación de calcio con cafeína 3,8 mM. *Trazo en rojo:* Vesículas incubadas como en la condición anterior fueron subsecuentemente incubadas por 15 minutos con GSH 5 mM, luego se cargaron con calcio y se indujo la liberación con cafeína 3,8 mM. En ambos trazos se muestra el primer evento de liberación de calcio inducido por cafeína y las oscilaciones posteriores.



minutos, lo que redujo el  $T_L$  a 310 s y aumentó la frecuencia de las oscilaciones (trazo en rojo), retornando así a una respuesta comparable con las vesículas sin oxidar. El efecto de la oxidación también se revirtió incubando las vesículas previamente oxidadas con otro agente reductor de grupos SH, ditioneitol 3 mM (datos no mostrados)

## **II. LIBERACION DE CALCIO DESDE VESICULAS DE RETICULO SARCOPLASMATICO SIN CALSECUESTRINA**

Como se presenta en mayor detalle en la Introducción, existen evidencias que sugieren un papel regulatorio para la calsecuestrina en la liberación de calcio. Para investigar la participación de esta proteína en el proceso de liberación de calcio, se realizaron experimentos de liberación de calcio en vesículas de RS con y sin calsecuestrina.

### **II. 1. Obtención de vesículas de RS de conejo sin calsecuestrina**

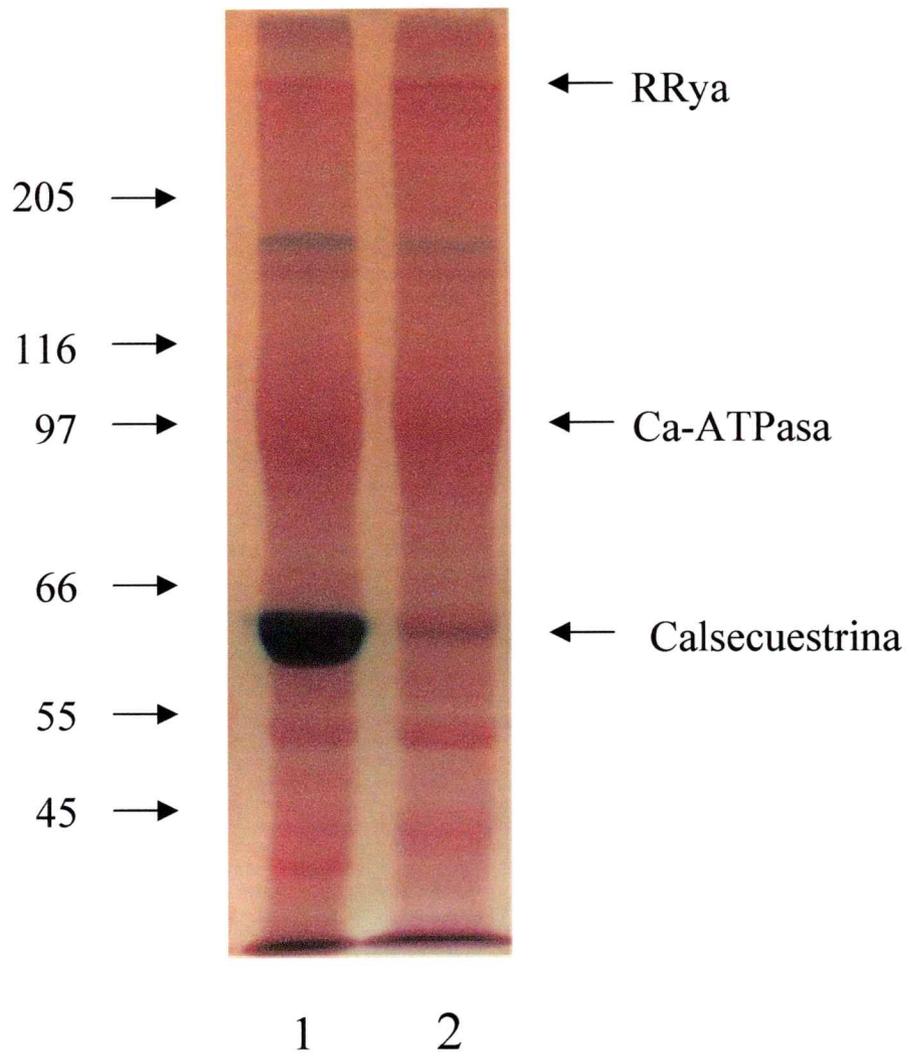
Para estudiar la participación de calsecuestrina en la captación y liberación de calcio se prepararon vesículas de RS selladas sin calsecuestrina y se utilizaron en experimentos de flujo.

En la Figura 20 se muestra el patrón electroforético de las proteínas de vesículas de RS nativas y de vesículas sin calsecuestrina, reveladas con Stains All. Con esta técnica se tiñen de color azul las proteínas que unen calcio y de color fucsia las otras proteínas (Campbell y cols., 1983). Las vesículas nativas (carril 1) presentan la

**FIGURA 20.**

**Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) de vesículas de retículo sarcoplasmático de conejo.**

Las vesículas de RS de conejo nativas enriquecidas en triadas (carril 1) y vesículas de RS de conejo sin calsecuestrina (carril 2) se separaron por SDS-PAGE en un gel al 7 % que fue teñido con el colorante Stains All.



calsecustrina como una banda de aproximadamente 60 kDa. Para extraer la calsecustrina, estas vesículas se sometieron a una incubación con 1 mM EGTA a pH 8,0 durante toda la noche a 4°C, lo cual logró remover la totalidad de esta proteína (carril 2). La banda remanente que se observa en el carril 2 corresponde a otra proteína presente en el retículo sarcoplasmático que une calcio y que migra junto con calsecustrina (Ostwald y MacLennan, 1974a; 1974b). Esta proteína, a diferencia de calsecustrina, une calcio con gran afinidad ( $K_d \sim 2,5$  a  $4 \mu\text{M}$ ) y con baja capacidad (1 mol de calcio por mol de proteína) (Ostwald y MacLennan, 1974a, 1974b). Para corroborar la ausencia total de calsecustrina en las vesículas tratadas, se examinaron los geles tñiéndolos con plata. La calsecustrina no se tñe con este indicador sino que deja una mancha translúcida; en cambio, la proteína remanente en el gel que migra junto con calsecustrina sí se tñe con plata dejando una banda oscura (datos no mostrados).

Para eliminar el EGTA remanente proveniente del medio de extracción, las vesículas se pasaron a través de una columna de agarosa, como se describe en Materiales y Métodos. Con este método se obtuvo vesículas selladas sin calsecustrina que se pueden utilizar, por lo tanto, para los experimentos de flujo. Al eliminar el EGTA por lavados y centrifugación, las vesículas se rompían y no podían utilizarse para medir flujos.

## **II. 2. Captación y liberación de calcio en vesículas de RS sin calsecustrina.**

Se realizaron cargas pasivas de  $\text{Ca}^{2+}$  al equilibrio según se describe en Materiales y Métodos. Las vesículas de RS nativas acumularon  $142,5 \pm 9,8$  nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de

proteína (n=3). Las vesículas sin calsecuestrina, acumularon sólo  $26,9 \pm 3,6$  nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína (n=3).

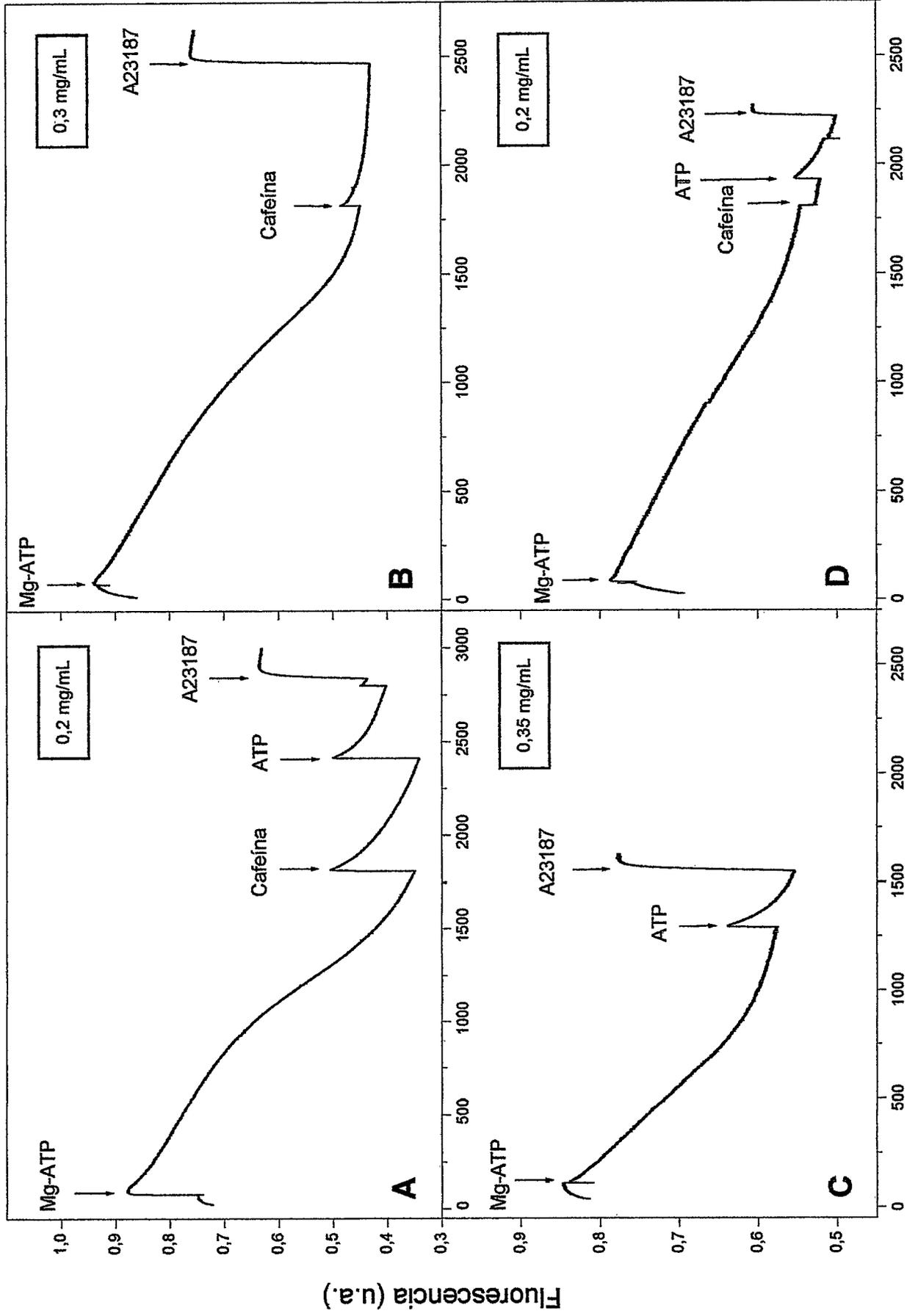
Las vesículas sin calsecuestrina retuvieron la capacidad de acumular calcio activamente. Los registros de tres experimentos ilustrados en la Figura 21 (paneles B, C y D) muestran que la fluorescencia del Calcium Green-2 disminuyó luego de la adición de Mg-ATP 2,33 mM ( $[\text{Mg}^{2+}]$  libre = 1,0 mM). Esto indica que las vesículas sin calsecuestrina acumularon calcio activamente, al igual que las vesículas control (Figura 21A). Al variar la concentración de proteínas se modificó la duración de la captación de calcio en vesículas sin calsecuestrina. En presencia de 0,3 mg/mL de vesículas sin calsecuestrina, el tiempo de captación fue de 28,5 minutos (panel B) y en presencia de 0,35 mg/mL fue de 19,2 minutos (panel C). Cuando se utilizó 0,2 mg/mL de vesículas sin calsecuestrina, la adición de Mg-ATP provocó una lenta acumulación de calcio; a los 30 minutos aun no se ha llegado a una línea basal que indique que la captación de calcio ha finalizado (panel D). El experimento con vesículas control ilustrado en el panel A se realizó con 0,2 mg/mL de vesículas y presentó un tiempo de captación de 28,3 minutos.

La posterior adición de cafeína 3,8 mM a las vesículas sin calsecuestrina indujo un evento de liberación de calcio transitorio de pequeña amplitud (Figura 21B) y la adición de  $\text{ATP}^{2-}$  1 mM también provocó una liberación de calcio transitoria (Figura 21C). Cuando se utilizó 0,2 mg/mL de vesículas sin calsecuestrina (panel D), la adición de cafeína 3,8 mM no indujo una liberación de calcio detectable con la metodología utilizada, pero con la subsecuente adición de  $\text{ATP}^{2-}$  1 mM sí se observó liberación. En estas tres condiciones, con la adición de A23187 se liberó el calcio que estaba

## FIGURA 21.

### **Liberación de calcio inducida por cafeína y ATP en vesículas de RS sin calsecuestrina.**

En los cuatro registros mostrados, las vesículas se cargaron activamente con la adición de Mg-ATP 2,33 mM ( $[Mg^{2+}]$  libre = 1,0 mM). En los tiempos indicados por las flechas se agregó cafeína 3,8 mM, ATP 1 mM ó A23187 1,9  $\mu$ M. **Panel A:** 0,2 mg/mL de vesículas de RS de conejo control. **Panel B:** 0,3 mg/mL de vesículas de RS sin calsecuestrina. **Panel C:** 0,35 mg/mL de vesículas de RS sin calsecuestrina. **Panel D:** 0,2 mg/mL de vesículas de RS sin calsecuestrina. A las vesículas de RS se les extrajo la calsecuestrina incubándolas toda la noche a 0°C en 1 mM EGTA pH 8,0; 0,3 M sacarosa. Para más detalles ver Materiales y Métodos.



Tiempo (s)

acumulado en las vesículas y deja de manifiesto que tanto cafeína como  $\text{ATP}^{2-}$  liberaron sólo una pequeña fracción del calcio acumulado.

En las vesículas control (Figura 21A), tanto cafeína como la subsecuente adición de  $\text{ATP}^{2-}$  1 mM provocaron una liberación transitoria de calcio que también fue sólo una fracción del calcio acumulado, pero representó una mayor cantidad neta de calcio liberado que en las vesículas sin calsecuestrina.

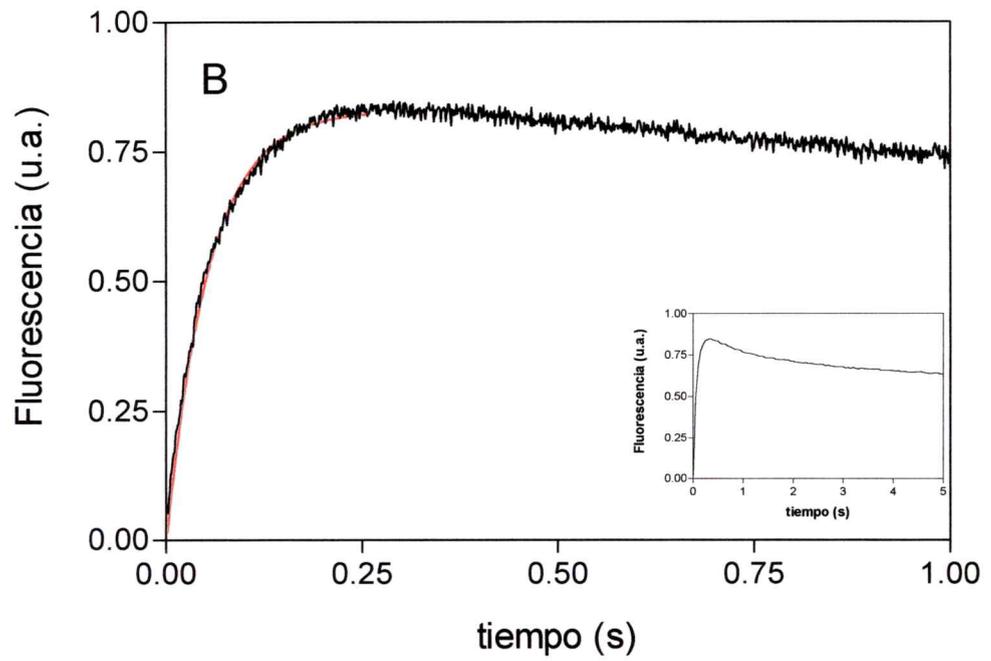
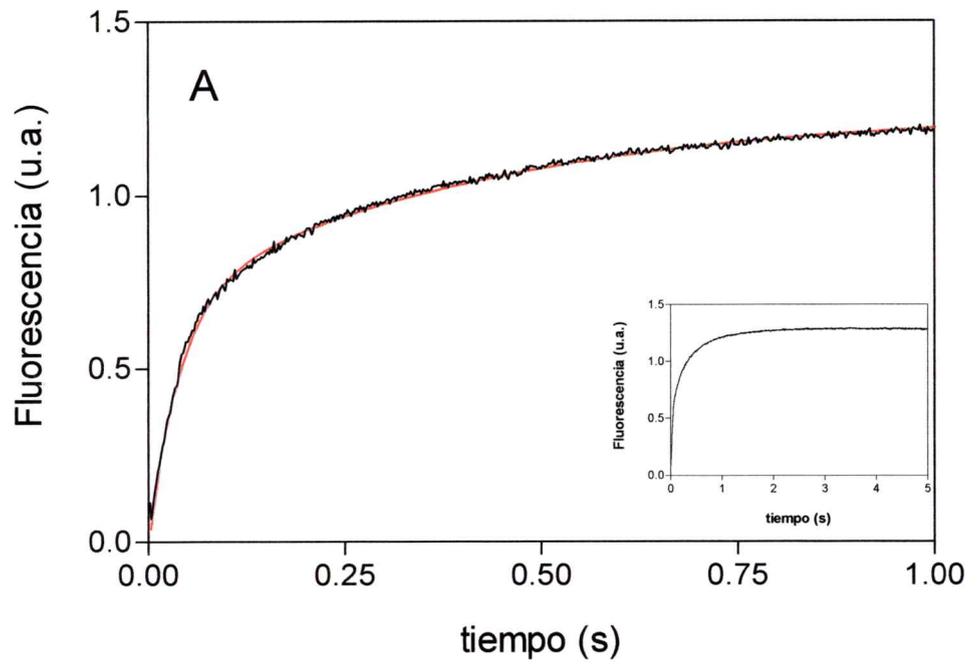
### **II. 3. Las vesículas sin calsecuestrina tienen una cinética de liberación inicial de calcio más lenta y de duración más corta.**

En un espectrofluorímetro de flujo detenido se determinó las velocidades iniciales de liberación inducidas por cafeína en las vesículas control y en las vesículas sin calsecuestrina. La liberación de calcio se indujo mezclando una solución que contenía las vesículas precargadas con calcio (solución III) con una solución que contenía cafeína en presencia de Calcium Green-2 (solución IV) (Ver Tabla 1 para la composición de las soluciones). Luego de la mezcla inicial 1:1 de estas soluciones las concentraciones de cada experimento fueron: vesículas 0,2 mg/mL,  $\text{Mg}^{2+}$  libre 1,0 mM, cafeína 4 mM; KCl 0,1 M; Mops Tris 20 mM, pH 7,2. En las vesículas control, la cafeína indujo una liberación de calcio que se ajusta a una exponencial doble con constantes de velocidades  $k_1 = 30,12 \pm 0,97 \text{ s}^{-1}$  y  $k_2 = 3,61 \pm 0,22 \text{ s}^{-1}$  (Figura 22A). En las vesículas sin calsecuestrina, la cafeína indujo una liberación de calcio más lenta que se ajusta a una sola exponencial, con una constante de velocidad  $k = 17,07 \pm 0,12 \text{ s}^{-1}$  seguida de activa reacumulación del calcio liberado (Figura 22B).

## FIGURA 22.

### **Cinética de la liberación de calcio inducida por cafeína en vesículas sin calsecuestrina.**

En un espectrómetro de fluorescencia de flujo detenido se mezcló 1:1 la solución III que contenía vesículas control 0,4 mg/mL (panel A) o vesículas sin calsecuestrina (panel B) con la solución IV que contenía cafeína 8,0 mM. Las vesículas presentes en la solución III se cargaron activamente con calcio antes de comenzar cada experimento. El cambio de  $[Ca^{2+}]$  libre del medio extravésicular se detectó con Calcium Green-2 presente en la solución III. **Panel A:** La liberación de calcio se ajustó a una exponencial doble (curva en rojo) con  $k_1 = 30,12 \pm 0,97 \text{ s}^{-1}$  (50,9% del cambio de fluorescencia) y  $k_2 = 3,61 \pm 0,22 \text{ s}^{-1}$  (49,1 % del cambio de fluorescencia). **Panel B:** La liberación de calcio inducida por cafeína en vesículas sin calsecuestrina se ajustó a una exponencial simple (curva en rojo) con  $k = 17,07 \pm 0,12 \text{ s}^{-1}$ . En los insertos de cada panel se muestran registros de 5 segundos realizados en las mismas condiciones anteriores.



La liberación rápida inicial de calcio inducida por cafeína en las vesículas sin calsecuestrina fue muy breve comparada con las vesículas control. Como lo muestra la Figura 22B, en las vesículas sin calsecuestrina la liberación rápida inicial se mantiene durante sólo 250 ms, y luego comienza a disminuir el calcio extravesicular debido a la disminución de la liberación mientras continúa la captación de calcio. A los 5 segundos, las vesículas sin calsecuestrina ya han captado parte del calcio liberado, como se observa en el inserto de la Figura 22B. Debido a esto, el ajuste de la señal de fluorescencia en las vesículas sin calsecuestrina se realizó sólo hasta los 250 ms (Figura 22B, trazo en rojo).

En las vesículas control la liberación inicial de calcio fue mucho más larga y se extendió durante por lo menos 5 segundos (inserto Figura 22A) antes de que las vesículas empezaran a reacumular el calcio liberado.

### **III. DISOCIACION DEL CALCIO UNIDO A CALSECUESTRINA**

La calsecuestrina une calcio con una gran capacidad y una afinidad moderada. Al unir calcio, esta proteína experimenta grandes cambios conformacionales. Debido a esta gran capacidad de unir calcio se le ha dado un papel de tampón luminal de calcio, lo que permite el almacenaje de grandes cantidades de este ion al interior del RS. Por otro lado, algunas evidencias sugieren que la calsecuestrina posee un papel regulatorio en la liberación de calcio desde el RS, que en condiciones de máxima estimulación tiene un  $t_{1/2}$  de 14 ms. Por lo tanto, es importante establecer la cinética de disociación del calcio unido a calsecuestrina para investigar si es una etapa limitante en el proceso de

liberación de calcio. No existe hasta ahora información sobre este proceso en la literatura.

### **III. 1. Permeabilización de vesículas de RS**

Se prepararon vesículas de RS de conejo permeabilizadas para tener acceso a la calscuestrina y estudiar los cambios estructurales que experimenta al unir calcio en su ambiente nativo.

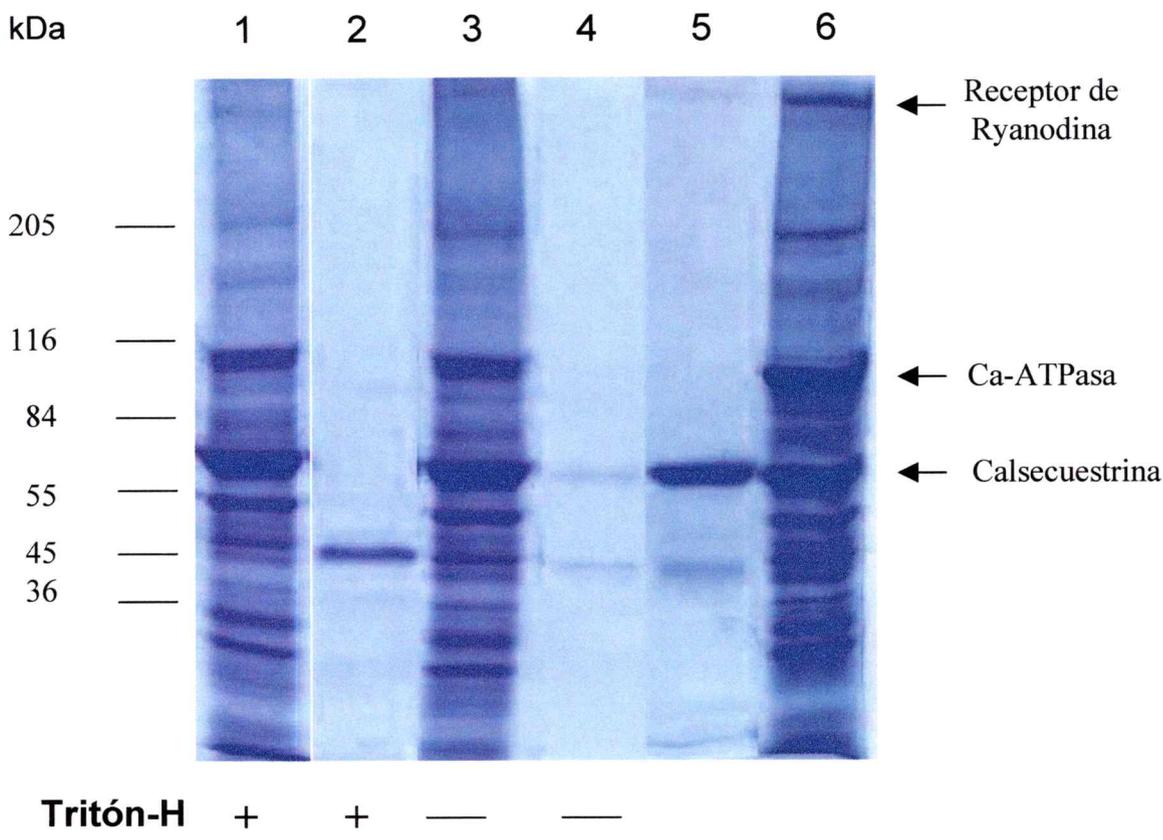
Para permeabilizar las vesículas de RS enriquecidas en triadas, se probaron distintos detergentes (deoxicolato de sodio, Tritón X-100, Tritón X-100 Hidrogenado, saponina). Se realizaron titulaciones con pequeñas adiciones de cada detergente midiendo la turbidez de las triadas a 350 nm y 540 nm. Con deoxicolato de sodio y saponina, la permeabilización de las vesículas fue drástica. Aun al adicionar pequeñas cantidades de cada detergente no se pudo controlar el grado de permeabilización. Esto provocó una solubilización de algunas proteínas de la triada. Con Triton X-100 y con Triton X-100 Hidrogenado (Triton-H) en una concentración de 0,02%, se obtuvo vesículas permeabilizadas que no perdieron las proteínas de la estructura de la triada. Los resultados se evidenciaron observando el patrón electroforético de las vesículas tratadas con detergente en geles de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) (datos no mostrados). De estos dos últimos detergentes se eligió Triton-H porque no es fluorescente y carece de absorbancia UV, por lo que no interfiere con los ensayos espectroscópicos, a diferencia de Triton X-100.

En la Figura 23 se muestra el resultado de una SDS-PAGE, donde se observa que toda la calscuestrina de vesículas tratadas con Tritón-H quedó en el sedimento, es decir,

**FIGURA 23.**

**Patrón electroforético de proteínas de vesículas de RS de conejo permeabilizadas con Tritón X-100 Hidrogenado (Tritón-H).**

Se muestra un gel de proteínas SDS-PAGE en gradiente del 2 al 12% teñido con Azul de Coomassie. *Carril 1:* sedimento de vesículas de RS permeabilizadas con Tritón-H 0,02%. *Carril 2:* sobrenadante de la permeabilización de las vesículas con Tritón-H 0,02%. *Carril 3:* sedimento de vesículas de RS tratadas en las mismas condiciones de la permeabilización pero sin detergente (control). *Carril 4:* sobrenadante de las vesículas control. *Carril 5:* calsecuestrina purificada a partir de vesículas de RS de conejo. *Carril 6:* vesículas de RS nativas enriquecidas en triadas. Para más detalle ver Materiales y Métodos.



asociada a la triada (carril 1). En el sobrenadante, quedó solubilizada una proteína de 45 kDa (carril 2) que no une calcio, según lo sugiere la tinción con Stains All de preparaciones de triadas mostradas en las Figuras 20 y 27 (carriles 1), ya que no se tiñe de color azul característico de las proteínas que unen calcio (Campbell y cols., 1983). Esta proteína puede corresponder a actina. Los carriles 3 y 4 de la Figura 23 corresponden al sedimento y al sobrenadante, respectivamente, de triadas tratadas igual que las vesículas permeabilizadas pero sin detergente (control). En el carril 5 se muestra la calsecuestrina purificada de músculo esquelético de conejo y en el carril 6 triadas de conejo nativas.

Con este procedimiento se obtuvo vesículas permeabilizadas que mantienen las proteínas de la triada y en las cuales se tiene accesibilidad al ambiente que rodea la calsecuestrina.

### **III. 2. Cambios de fluorescencia asociados con la unión de calcio a calsecuestrina**

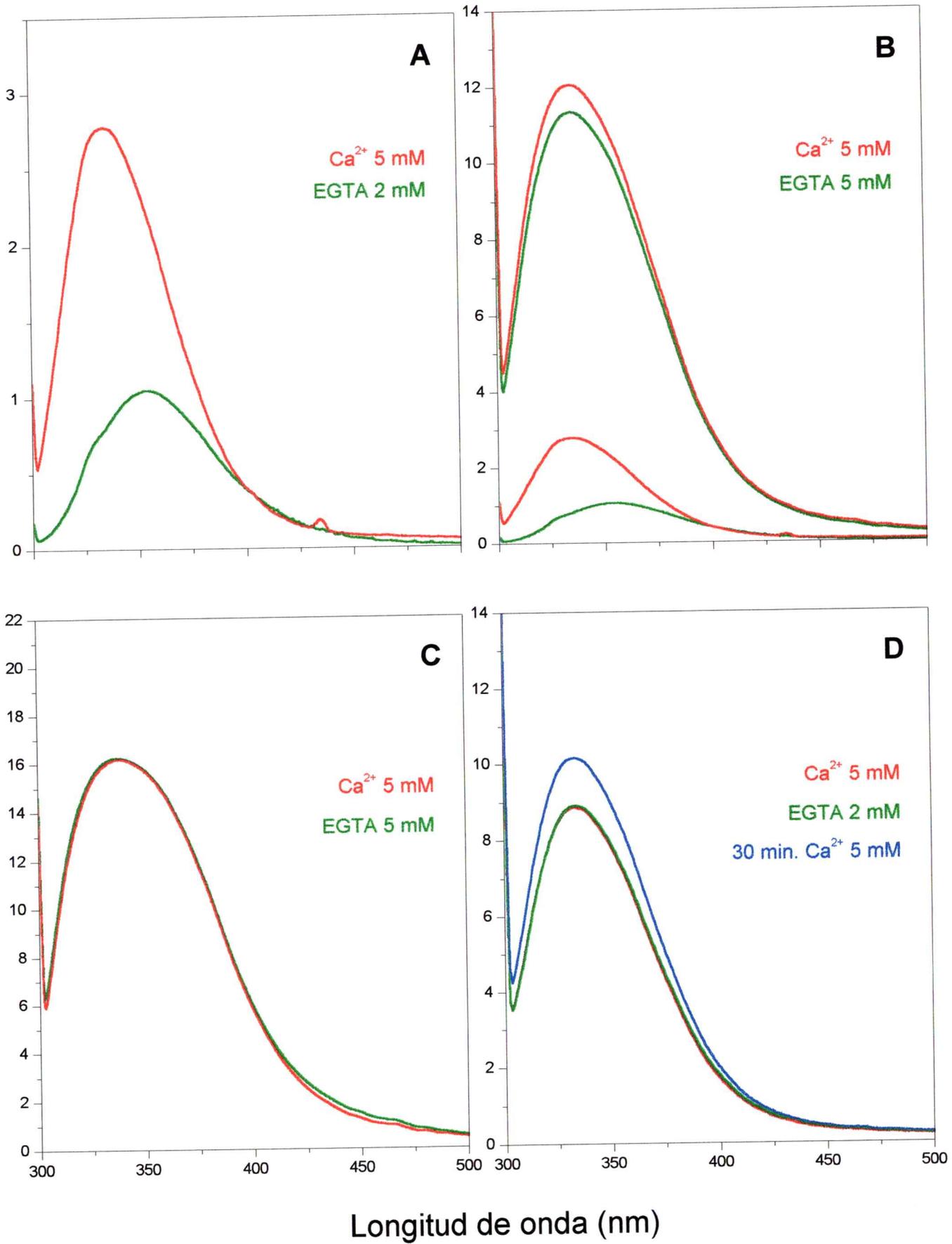
Los grandes cambios estructurales que experimenta la calsecuestrina al unir calcio, se reflejan en parte en los cambios en la fluorescencia intrínseca que sufre la proteína debido a la internalización de grupos triptófanos. Estos cambios han sido estudiados en el laboratorio midiendo la fluorescencia intrínseca de la proteína en estado estacionario en presencia de  $[Ca^{2+}]$  crecientes y en función del pH (Hidalgo y cols. 1996). En la Figura 24 (panel A) se muestra el cambio en la fluorescencia intrínseca de calsecuestrina que ocurre por la unión de  $Ca^{2+}$  a esta proteína. Desde el estado libre de  $Ca^{2+}$  (EGTA 2 mM, trazo en verde) al estado saturado de  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  5 mM, trazo en

#### **FIGURA 24.**

##### **Cambios en la fluorescencia intrínseca de calsecuestrina asociados con la unión de calcio.**

Se muestran espectros de emisión en un medio con  $\text{Ca}^{2+}$  (trazos en rojo) o en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (trazos en verde). Los espectros se obtuvieron excitando a 295 nm. **Panel A:** calsecuestrina purificada de conejo en solución (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). **Panel B:** vesículas de RS enriquecidas en triadas (0,5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) permeabilizadas con Tritón-H 0,02%; las líneas punteadas corresponden a los espectros de calsecuestrina purificada mostrados en el panel A. **Panel C:** vesículas de retículo sarcoplasmático longitudinal (0,5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) permeabilizadas con Tritón-H 0,02%. **Panel D:** vesículas de RS enriquecidas en triadas (0,2  $\text{mg}/\text{mL}$ ) sin permeabilizar. En el panel D, el trazo en azul corresponde a vesículas sin permeabilizar incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

Fluorescencia (u.a.)



Longitud de onda (nm)

rojo), la fluorescencia aumentó 2,8 veces y se produjo un corrimiento de 18 nm hacia el azul en la longitud de onda máxima de emisión.

Las vesículas de RS de conejo, enriquecidas en triadas, permeabilizadas con Tritón-H 0,02 % también experimentaron cambios en la fluorescencia intrínseca debido a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el panel B de la Figura 24 se muestra este efecto. La fluorescencia intrínseca de estas vesículas permeabilizadas aumentó en presencia de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$  5 mM, trazo en rojo) comparada con la fluorescencia en un medio sin calcio (EGTA 5 mM, trazo en verde). Sin embargo, en las vesículas de RS no hubo corrimiento al azul en la longitud de onda máxima de emisión. Las líneas punteadas corresponden a los espectros de la calsecuestrina purificada mostrados en el panel A.

Como control, se utilizó una preparación de RS longitudinal de conejo que se permeabilizó en las mismas condiciones de las vesículas de RS enriquecidas en triadas. El RS longitudinal contiene altos niveles de la bomba de calcio del RS, la Ca-ATPasa (aproximadamente un 80% del total del contenido proteico) y no posee calsecuestrina. La fluorescencia intrínseca del RS longitudinal permeabilizado fue la misma en un medio con calcio ( $\text{Ca}^{2+}$  5 mM) y en un medio sin calcio (EGTA 5mM) (panel C), lo que sugiere que el cambio de fluorescencia observado en las vesículas de RS enriquecidas en triadas (panel B) se debe mayoritariamente a calsecuestrina. También se midió la fluorescencia intrínseca de vesículas de RS nativas enriquecidas en triadas (sin permeabilizar) en presencia ( $\text{Ca}^{2+}$  5 mM) y en ausencia de calcio (EGTA 2 mM), la que permaneció constante (panel D, trazos en rojo y verde). Sólo se observó un aumento de la fluorescencia de las vesículas nativas, luego de una incubación durante 30 minutos en presencia de calcio (trazo en azul), lo que indica que no es suficiente la sola presencia de

calcio sino que éste debe ingresar a las vesículas y como consecuencia sólo aumenta la fluorescencia intrínseca tras unirse el calcio luminal a calsecuestrina.

### **III. 3. Preparación de membranas de la zona de unión del RS (JFM):**

Para estudiar la cinética de la disociación del calcio unido a la calsecuestrina asociada a membranas, se realizó una preparación de membranas de la zona de unión del RS con el T-T (JFM, del inglés *junctional face membranes*), de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Las JFM son fragmentos de membranas que tienen un elevado contenido de calsecuestrina aun asociado a ellas. En estas membranas se pudo medir satisfactoriamente la cinética de los cambios de calcio libre que se generaron luego de la disociación del calcio unido a calsecuestrina, utilizando un indicador fluorescente de calcio. Para estos experimentos no se pudo utilizar las vesículas de RS permeabilizadas por los siguientes motivos: i) las vesículas permeabilizadas contienen menos calsecuestrina que las JFM (aproximadamente 25% versus 50% del contenido de proteína total, según se determinó por el análisis densitométrico de geles SDS-PAGE), por lo que el cambio del calcio libre luego de la disociación del calcio unido a esta proteína fue significativamente menor y más difícil de medir en las vesículas que en las JFM; ii) en las vesículas, el acceso a la calsecuestrina y al cambio del calcio libre, dependían de la permeabilización de éstas, lo que generó resultados cinéticos variables; en cambio, en las JFM, se tuvo un acceso más expedito a la calsecuestrina ya que las membranas estaban rotas producto del procedimiento de su preparación y se obtuvo resultados reproducibles; y iii) en las vesículas permeabilizadas está presente la Ca-ATPasa, que si bien se demostró que no interfiere en los cambios de

fluorescencia intrínseca asociados con la unión de calcio a calsecuestrina, de todas formas genera una fluorescencia intrínseca basal alta que provoca una disminución de la sensibilidad de la señal de fluorescencia; con las JFM se elimina cualquier posible interacción y se aumenta la sensibilidad de la medición del cambio de fluorescencia, ya que estas membranas no contienen la bomba de calcio reticular.

En la Figura 25 se muestra una microfotografía electrónica de una vesícula de RS terminal y de JFM (tomada de Costello y cols, 1986). La estructura de estas membranas son similares a las preparaciones utilizadas en esta tesis. En la Figura 25b se observa claramente la mayor densidad de calsecuestrina presente en las membranas rotas de las JFM (contenido electrodensito al interior), en las cuales permanece asociado también el RyR (cabezas de flechas). La vesícula de RS terminal (Figura 25a) contiene significativamente menos calsecuestrina y está localizada sólo en un extremo de la vesícula (contenido electrodensito en la zona de unión de los RyR). Estas vesículas además contienen Ca-ATP-asa (doble cabeza de flecha).

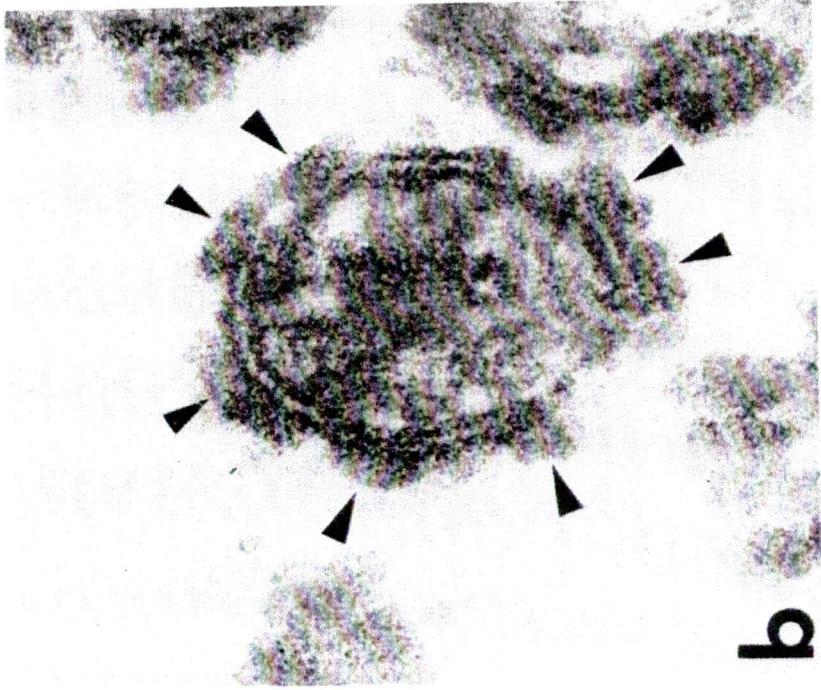
En esta tesis se observó el patrón electroforético de las JFM y de los sobrenadantes de las distintas etapas de la preparación de estas membranas. Los geles se tiñeron con azul de Comassie (Figura 26) y luego con Stains All (Figura 27). Las JFM contienen gran cantidad de calsecuestrina (aproximadamente un 50% de la proteína total, medido por análisis densitométrico) (carril 5) y conservan otras proteínas de la zona de unión como el RyR; en cambio, prácticamente no contienen Ca-ATPasa, la que quedó en el sobrenadante de solubilización de las triadas durante el proceso de preparación de las JFM (carril 3).

**FIGURA 25.**

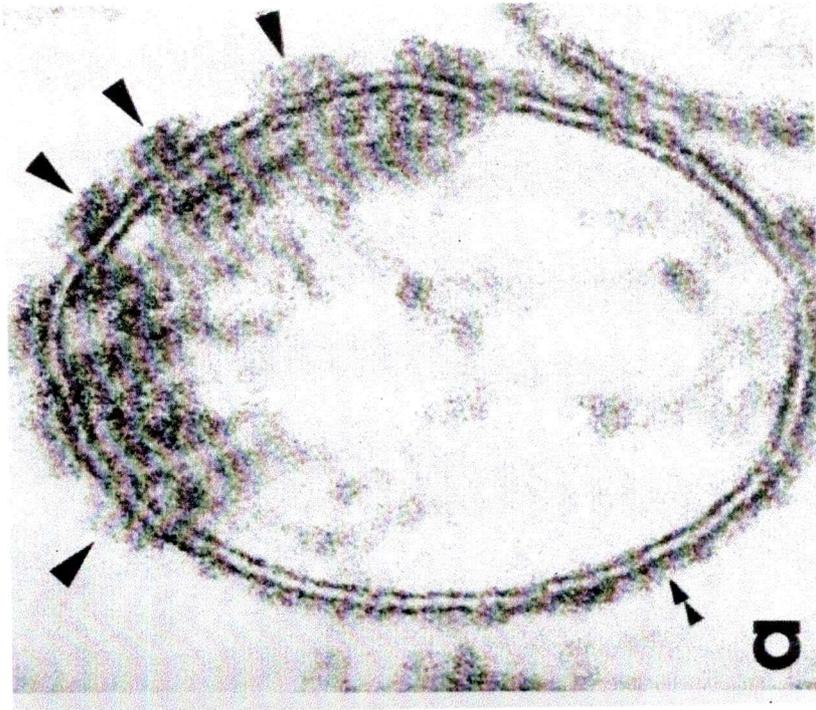
**Microfotografía electrónica de vesículas de RS terminal y membranas de la zona de unión (JFM).**

**a:** Vesículas de RS terminal. **b:** Membranas de la zona de unión (JFM). Cabezas de flechas indican el receptor de ryanodina (en a y en b). Dobles cabezas de flechas indican la Ca-ATPasa (en a).

*Figura tomada de Costello y cols, 1986.*



**b**



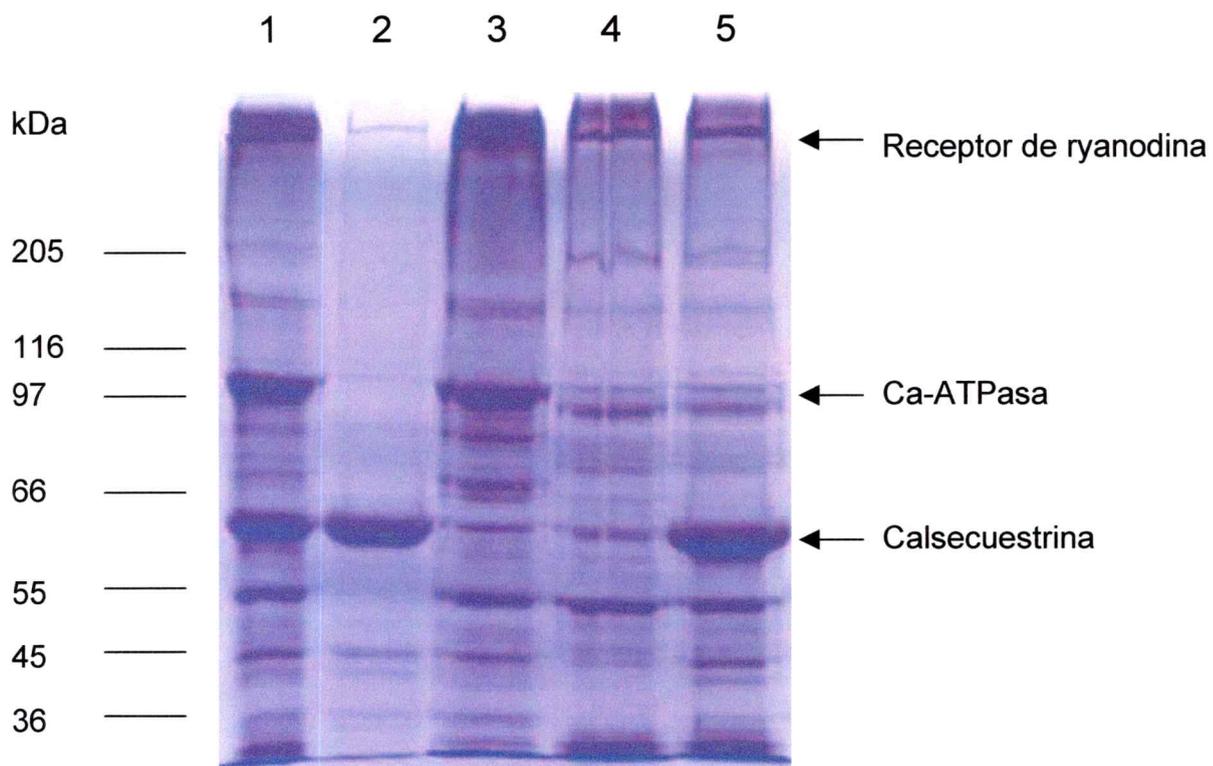
**a**

**FIGURA 26.**

**Patrón electroforético de proteínas de las etapas de preparación de membranas de la zona de unión (JFM).**

Se muestra un gel SDS-PAGE en gradiente del 2 al 12% teñido con Azul de Coomassie.

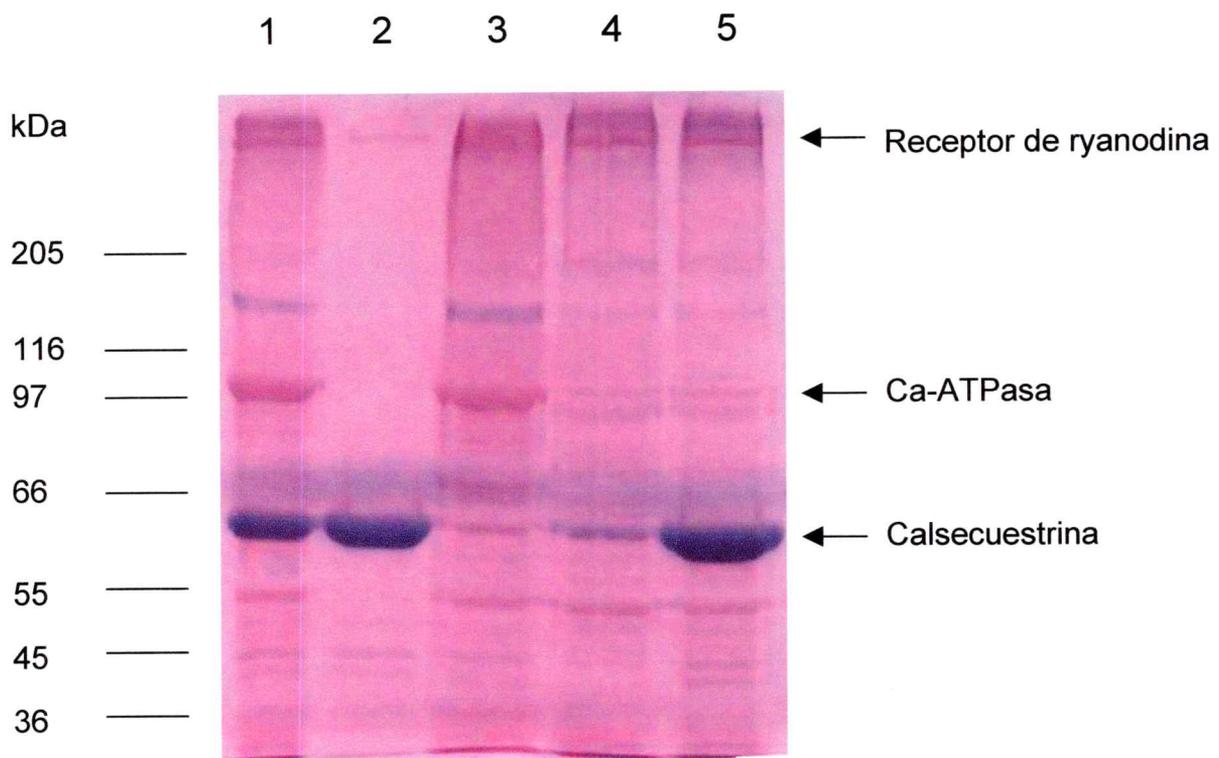
**Carril 1:** vesículas de RS nativas enriquecidas en triadas. **Carril 2:** sobrenadante de la extracción de calsecuestrina desde JFM. **Carril 3:** sobrenadante de la permeabilización de vesículas de RS en la obtención de JFM. **Carril 4:** JFM sin calsecuestrina (sedimento de la extracción de calsecuestrina). **Carril 5:** JFM (sedimento de la permeabilización de las vesículas de RS). Para más detalle ver Materiales y Métodos.



**FIGURA 27.**

**Patrón electroforético de proteínas de las etapas de preparación de membranas de la zona de unión (JFM).**

El gel mostrado en la Figura 24 se destiñó con metanol y luego se tiñó con el colorante Stains All. *Carril 1:* vesículas de RS nativas enriquecidas en triadas. *Carril 2:* sobrenadante de la extracción de calsecuestrina desde JFM. *Carril 3:* sobrenadante de la permeabilización de vesículas de RS en la obtención de JFM. *Carril 4:* JFM sin calsecuestrina (sedimento de la extracción de calsecuestrina). *Carril 5:* JFM (sedimento de la permeabilización de las vesículas de RS). Para más detalle ver Materiales y Métodos.



Para los experimentos control se prepararon JFM sin calsecuestrina (JFM-Cs) de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Estas JFM-Cs contenían las mismas proteínas de las JFM a excepción de calsecuestrina (carril 4), cuya totalidad se retuvo en el sobrenadante de extracción (carril 2).

### **III. 4. Cinética de la disociación del calcio unido a calsecuestrina**

La cinética de la disociación del calcio unido a calsecuestrina se estudió utilizando calsecuestrina en solución purificada de músculo esquelético de conejo y calsecuestrina unida a las membranas de las cisternas terminales (JFM).

En un espectrofotómetro de flujo detenido se midió la cinética de la disociación del calcio unido a calsecuestrina, mezclando la proteína purificada o las JFM, ambas saturadas en calcio, con una solución que contenía BAPTA en presencia de Calcium Green-2.

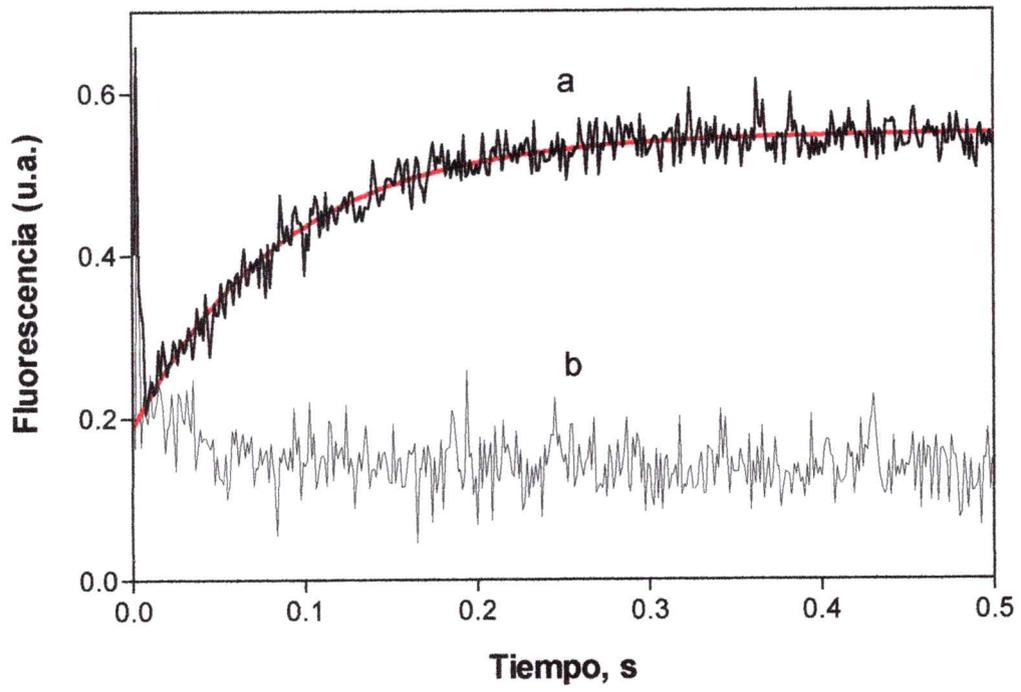
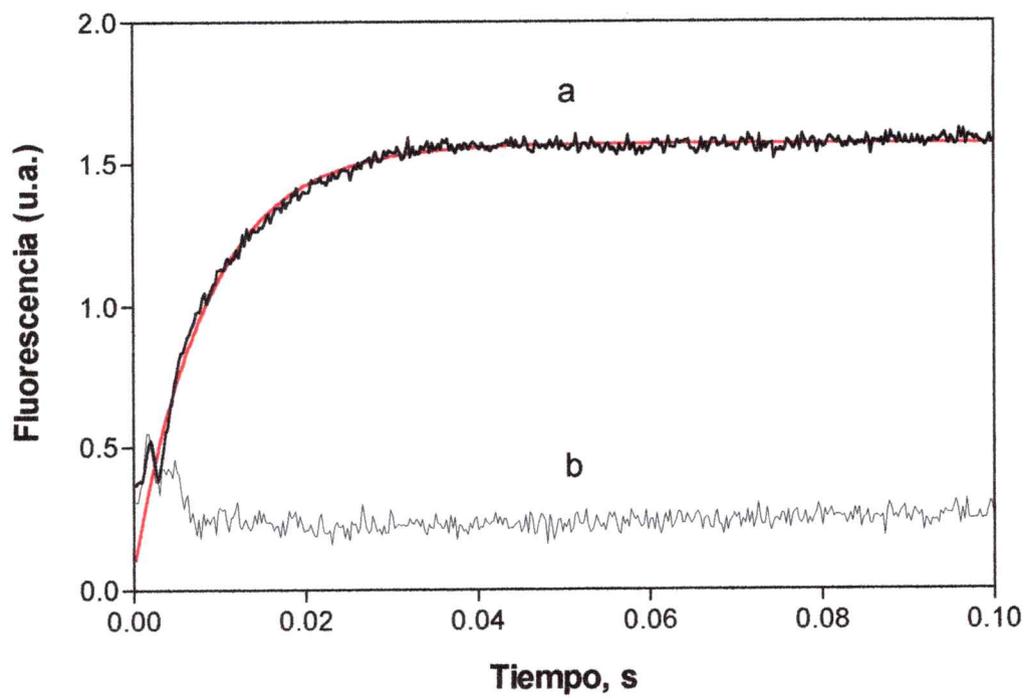
#### ***III. 4. a. Calsecuestrina en solución***

Se utilizó dos soluciones que se mezclaron en proporción 10:1 en el espectrofotómetro de flujo detenido. La primera solución contenía calsecuestrina 110  $\mu\text{g/mL}$  en  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (solución V) y la segunda contenía BAPTA 13,2 mM en presencia de Calcium Green-2 (solución VI). Cuando la calsecuestrina saturada en calcio se mezcló con la solución libre de calcio, el calcio unido se disoció de la calsecuestrina, lo que fue detectado por un aumento de la señal de fluorescencia del Calcium Green-2. En la Figura 28A (trazo a en negro) se muestra una señal promedio de 9 registros. Esta señal se ajustó a una exponencial simple (trazo en rojo) entregando un valor de  $k = 11,53$

## FIGURA 28.

**Cinéticas de disociación del calcio unido a calsecuestrina en solución (panel A) o asociada a membranas (panel B).**

**Panel A:** Una solución que contenía calsecuestrina 110  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (solución V), se mezcló con una solución que contenía BAPTA 13,2 mM en presencia de Calcium Green-2 (solución VI) en una proporción 10:1 (trazo a). Se muestra una señal promedio de 9 registros. Esta señal se ajustó a una exponencial simple con un  $k = 11,53 \text{ s}^{-1}$  (curva en rojo). El trazo b es la señal que genera una mezcla de las mismas soluciones anteriores pero sin proteína. **Panel B:** Se mezcló en una proporción 10:1 una solución que contenía JFM 3,3 mg/mL pre-equilibradas con  $\text{Ca}^{2+}$  2,2, mM (solución VII) con una solución que contenía BAPTA 0,286 mM en presencia de Calcium Green-2 (solución VIII). La señal resultante (trazo a) es el promedio de 4 registros y se ajustó a una exponencial simple con un  $k = 109,0 \text{ s}^{-1}$  (curva en rojo). Al mezclar las mismas soluciones pero con JFM-Cs en la solución VII, se obtuvo el trazo b. Los registros se obtuvieron excitando a 506 nm. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

**A****B**

$\pm 0,32 \text{ s}^{-1}$ . El aumento de fluorescencia se completó aproximadamente a los 400 ms. Al mezclar las mismas soluciones anteriores pero sin proteína, no se observó un cambio en la fluorescencia, la que permaneció en el nivel basal (trazo **b**).

#### **III. 4. b. Calsecuestrina asociada a las JFM**

Las JFM se pre-equilibraron con  $\text{Ca}^{2+}$  durante 36 horas. Estas membranas saturadas con  $\text{Ca}^{2+}$  (JFM 3,3 mg/mL;  $\text{CaCl}_2$  2,2 mM) (solución VII) se mezclaron en el espectrofotómetro de flujo detenido con BAPTA 0,286 mM (solución VIII), lo que provocó una rápida disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  unido. Esto se detectó por el aumento de la señal de fluorescencia del Calcium Green-2, como se observa en la señal promedio de 4 registros mostrada en la Figura 28B (trazo **a** en negro). Este registro se ajustó a una exponencial simple y se obtuvo un valor de  $k = 109,0 \pm 1,4 \text{ s}^{-1}$  (trazo en rojo). El aumento de fluorescencia se completó a los 40 ms. Al utilizar JFM sin calsecuestrina pre-equilibradas en las mismas condiciones anteriores, no se observó cambio en la señal de fluorescencia (trazo **b**).

#### **III. 5. Cinética de los cambios en la fluorescencia intrínseca de calsecuestrina**

La cinética de los cambios conformacionales de la calsecuestrina se monitorearon por medio de su fluorescencia intrínseca en las mismas condiciones anteriores, es decir, mezclando calsecuestrina (en solución o asociada a membranas) saturada en calcio con una solución que contenía BAPTA.

### **III. 5. a. Calsecuestrina en solución**

La disociación del calcio unido a calsecuestrina purificada provocó una disminución de la fluorescencia intrínseca de calsecuestrina. Esto se observó luego de mezclar, en el espectrofotómetro de flujo detenido, la proteína saturada en calcio con una solución que contenía BAPTA. En la Figura 29A (trazo **a** en negro) se muestra la señal promedio de 5 registros. Esta señal se ajustó a una exponencial simple, entregando un  $k = 6,46 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$  (trazo en rojo). A los 500 ms ya se ha completado el cambio importante en la fluorescencia intrínseca, como se observa en el inserto de la Figura 29A. La mezcla de las soluciones sin proteína no generó cambios en el nivel de fluorescencia (trazo **b**).

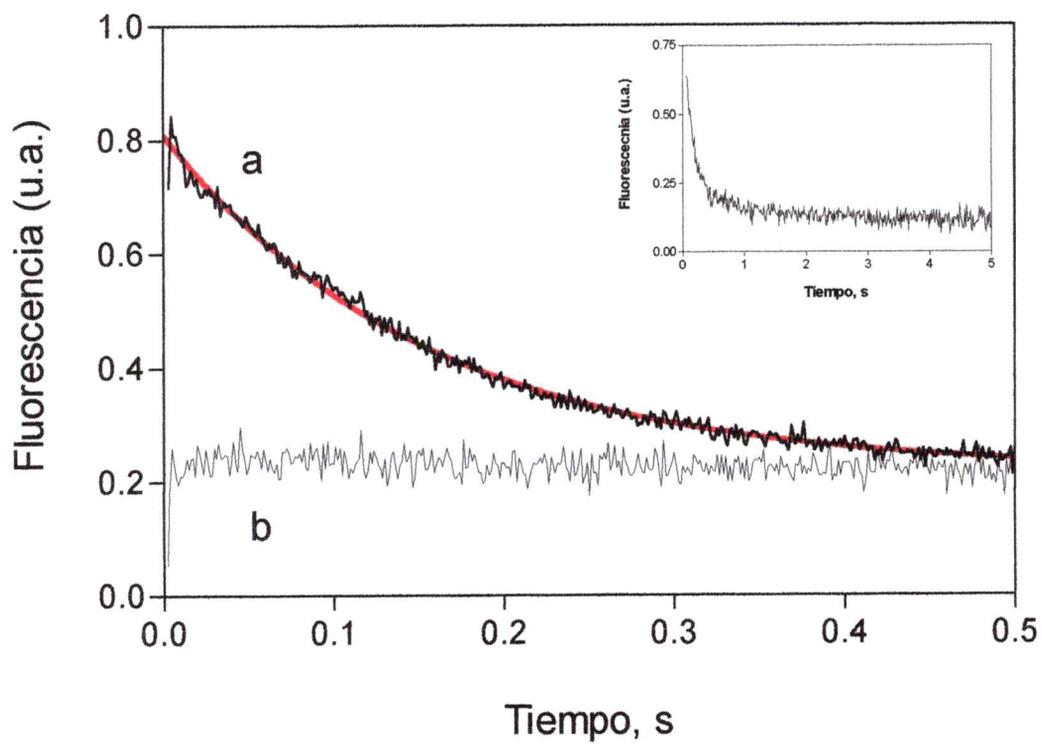
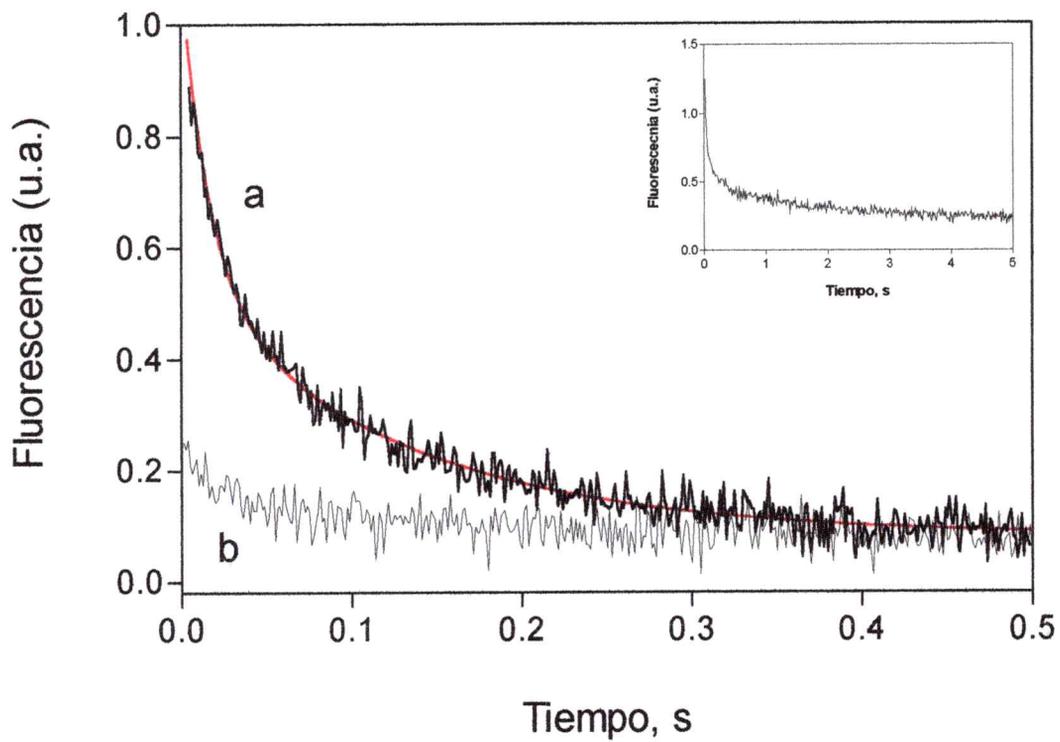
### **III. 5. b. Calsecuestrina asociada a las JFM**

La fluorescencia intrínseca de la calsecuestrina unida a membranas pre-equilibradas en calcio, también disminuyó al disociarse el calcio. Al mezclar en el espectrofotómetro de flujo detenido JFM saturadas con calcio con una solución que contenía BAPTA, la señal de fluorescencia intrínseca disminuyó rápidamente. En la Figura 29B (trazo **a** en negro) se muestra una señal promedio de 4 registros que se ajustó a una exponencial doble. Los valores de  $k$  fueron  $k_1 = 54,12 \pm 2,3 \text{ s}^{-1}$  y  $k_2 = 6,88 \pm 0,29 \text{ s}^{-1}$  con un peso de 55,4% y 44,6%, respectivamente. El cambio importante de fluorescencia intrínseca ya se ha completado a los 500 ms, como se muestra en el registro del inserto de la Figura 29B. Las JFM sin calsecuestrina no experimentaron un cambio en la señal de fluorescencia intrínseca, la que permaneció en un nivel basal (trazo **b**). Estas JFM-Cs presentaron además una fluorescencia baja, debido a que no

## FIGURA 29.

**Cinéticas del cambio de fluorescencia intrínseca de calsecuestrina por la disociación del calcio unido a calsecuestrina en solución (panel A) o asociada a membranas (panel B).**

Las condiciones fueron las mismas de la Figura 28 pero se excitó a 295 nm. **Panel A:** La mezcla de las soluciones VI y VII generó el trazo **a** que se ajustó a una exponencial simple con un  $k = 6,46 \text{ s}^{-1}$  (curva en rojo). Se muestra una señal promedio de 5 registros. El trazo **b** es la señal de una mezcla de estas mismas soluciones sin proteína. **Panel B:** La señal obtenida por la mezcla de JFM saturadas en calcio (solución VII) con BAPTA (solución VIII) generó el trazo **a** que se ajustó a una exponencial doble con  $k_1 = 54,12 \text{ s}^{-1}$  (55,4 % del cambio de fluorescencia) y  $k_2 = 6,88 \text{ s}^{-1}$  (44,6 % del cambio de fluorescencia) (curva en rojo). Se muestra la señal promedio de 4 registros. Al mezclar JFM-Cs saturadas en calcio se obtuvo el trazo **b**. En el inserto de cada panel se muestran registros de 5 s obtenidos según las condiciones de los trazos **a** respectivos. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

**A****B**

poseen calsecuestrina. Por otro lado, al mezclar las JFM saturadas en  $\text{Ca}^{2+}$  con una solución que contenía el mismo nivel de calcio, no se visualizó cambio alguno en la fluorescencia intrínseca de estas membranas (datos no mostrados), lo que indica que se necesita un gradiente de calcio para que las JFM puedan disociar el calcio unido y experimentar así un cambio en la fluorescencia intrínseca. Con esto se descarta también algún efecto de la dilución de la proteína.

En la tabla 5 se resumen los valores promedios de las constantes de velocidad de disociación del calcio unido y de los cambios de fluorescencia intrínseca, que fueron obtenidos en calsecuestrina purificada de conejo en solución y en calsecuestrina asociada a membranas (JFM). La disociación del calcio unido a la calsecuestrina asociada a membranas fue 9,5 veces más rápida que la disociación desde la calsecuestrina purificada en solución. Los cambios en la fluorescencia intrínseca de calsecuestrina debido a la disociación del calcio unido, también fueron mucho más rápidos en la proteína asociada a membranas con un valor de  $k$  8,5 veces mayor que el de la calsecuestrina en solución.

**Tabla 5**

**Comparación entre las constantes de velocidad de  
la disociación de calcio y  
los cambios de fluorescencia intrínseca**

| Calsecuestrina en: | Disociación<br>de calcio<br><br>$k, s^{-1}$ | Fluorescencia<br>Intrínseca<br><br>$k, s^{-1}$                  |
|--------------------|---|---|
| Solución           | $11,53 \pm 0,32$<br>(n = 9)                 | $6,46 \pm 0,08$<br>(n = 5)                                      |
| Membranas<br>(JFM) | $109,0 \pm 1,4$<br>(n = 4)                  | $54,12 \pm 2,3$ (55,4 %)<br>$6,88 \pm 0,29$ (44,6 %)<br>(n = 4) |

## DISCUSION

### Oscilaciones de liberación de calcio en vesículas enriquecidas en triadas

En esta tesis se ha trabajado con una preparación vesicular que sorprendentemente presentó un patrón oscilatorio de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Previo a este estudio, sólo se habían observado oscilaciones producidas por cafeína en células y en fibras musculares. No existen reportes que muestren oscilaciones de calcio en vesículas de RS. Los resultados de esta tesis muestran que en las vesículas de RS enriquecidas en triadas y activamente cargadas con  $\text{Ca}^{2+}$ , la cafeína indujo una liberación transitoria y parcial de  $\text{Ca}^{2+}$  seguida de un comportamiento oscilatorio de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las oscilaciones se observaron solamente en determinadas  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre, siendo la concentración óptima entre 0,1 y 0,5 mM en vesículas nativas. Las concentraciones de  $\text{ATP}^{2-}$  libre y de  $\text{Ca}^{2+}$  extravésicular fueron 0,15 mM y 100–200 nM, respectivamente. Todos estos valores están cercanos a sus respectivas concentraciones fisiológicas en músculo en reposo. Además, los resultados mostraron que en vesículas extensamente cargadas con  $\text{Ca}^{2+}$ , el comportamiento oscilatorio no se modificó, lo que demuestra que un vaciamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal no es la causa de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La liberación transitoria, parcial y oscilatoria de  $\text{Ca}^{2+}$  también se observó luego de la adición de otro agonista, AMP-PNP, aunque el patrón oscilatorio fue mucho menos frecuente. Adicionalmente, se registraron oscilaciones aun en ausencia de agonistas farmacológicos, con la sola presencia de reguladores fisiológicos como  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{ATP}^{2-}$ ,  $\text{Mg-ATP}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos resultados extienden reportes previos que describen oscilaciones

inducidas por cafeína en células y en fibras musculares (Fabiato y Fabiato, 1978; Herrmann-Frank, 1989; Wyskovsky, 1994).

### **Efecto de $Mg^{2+}$ sobre la liberación transitoria de calcio y el subsecuente comportamiento oscilatorio**

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que en  $[Ca^{2+}]$  de reposo (100 nM), la cafeína abre los canales de liberación de  $Ca^{2+}$  de vesículas de RS nativas en el intervalo de  $[Mg^{2+}]$  libre 0,05 mM a 2,5 mM. Al aumentar  $[Mg^{2+}]$  libre en este intervalo de concentración, disminuyó la magnitud del primer evento de liberación de  $Ca^{2+}$ , lo que indica que se redujo la fracción de canales abiertos. Al mismo tiempo, el aumento de  $[Mg^{2+}]$  libre desde 0,05 a 2,5 mM redujo drásticamente el valor de  $T_L$ , lo que indica una marcada disminución de la duración de la apertura de los canales inducida por cafeína. Además, el aumento de  $[Mg^{2+}]$  libre por sobre 1 mM anuló completamente las oscilaciones observadas en vesículas nativas después del primer evento de liberación de  $Ca^{2+}$ .

Estos resultados los interpretamos de acuerdo a un modelo en el cual, en presencia de  $Mg^{2+}$  extravésicular (citosólico) los canales de liberación se abren por cafeína o AMP-PNP y luego se cierran por  $Mg^{2+}$ , permitiendo la recaptación de  $Ca^{2+}$  al RS por la acción de la bomba de  $Ca^{2+}$ . Todos los canales presentes en las vesículas podrían responder a cafeína y  $Mg^{2+}$  en una manera sincrónica dentro de un intervalo pequeño de tiempo. De acuerdo a este modelo, en  $[Mg^{2+}]$  libre menor a 1 mM, una fracción de los canales cerrados se abre una vez más por cafeína o menos eficientemente por AMP-PNP, y nuevamente se cierran por  $Mg^{2+}$  en forma secuencial. En  $[Mg^{2+}]$  libre

más altas, los canales inicialmente abiertos por cafeína permanecerían cerrados por  $Mg^{2+}$  y no se producirían más oscilaciones.

### **Efecto de la oxidación y reducción de las vesículas**

Para demostrar que el sitio inhibitorio de  $Mg^{2+}$  está involucrado en generar el comportamiento de liberación oscilatorio, se utilizó reactivos redox que modifican la afinidad de este sitio (Donoso y cols., 2000). En todas las concentraciones de  $Mg^{2+}$  ensayadas, las vesículas reducidas presentaron valores de  $T_L$  menores que las vesículas nativas y que las vesículas oxidadas. Al aumentar  $[Mg^{2+}]$  de 0,05 mM hasta 0,5 mM y reducir las vesículas, las oscilaciones aumentaron. En  $[Mg^{2+}]$  1,0 mM las oscilaciones disminuyeron y en  $[Mg^{2+}]$  2,5 mM no se observaron oscilaciones. En vesículas oxidadas sólo se observaron oscilaciones en  $[Mg^{2+}]$  2,5 mM, lo que nunca se observó en vesículas reducidas y tampoco en vesículas nativas. El efecto de la oxidación se revirtió por incubación de las vesículas con un agente reductor como GSH y ditioneitol.

Los agentes oxidantes, al disminuir la afinidad del sitio para  $Mg^{2+}$  aumentarían la magnitud y la duración del primer evento de liberación de  $Ca^{2+}$ . En  $[Mg^{2+}] \leq 0,1$  mM, los agentes oxidantes permitieron una apertura máxima de los canales por cafeína, de modo que los canales en la continua presencia de cafeína no se cerraron. En  $[Mg^{2+}]$  intermedias (0,5 - 1,0 mM) los canales oxidados se abrieron por la adición de cafeína y luego se cerraron por  $Mg^{2+}$  sin experimentar oscilaciones. En  $[Mg^{2+}]$  más alta (2,5 mM) los canales tratados con agentes oxidantes permanecieron abiertos por más tiempo que los canales nativos para ser eventualmente cerrados por  $Mg^{2+}$  y abiertos de nuevo por cafeína con un patrón oscilatorio.

En contraste, los canales tratados con un agente reductor tendrían afinidades más altas por  $Mg^{2+}$  que los canales nativos. En  $[Mg^{2+}] \leq 1,0$  mM estos canales sólo se abrieron en forma transitoria después de la adición de cafeína y al primer evento de liberación le sucedieron oscilaciones de alta frecuencia. En  $[Mg^{2+}] > 1,0$  mM los canales tratados con un agente reductor también se abrieron brevemente por la adición de cafeína pero permanecieron cerrados por  $Mg^{2+}$  sin experimentar oscilaciones.

De acuerdo a los modelos propuestos (Laver y cols., 1997; Lamb y Laver, 1998) la unión de  $Mg^{2+}$  a dos sitios independientes provoca inhibición de la liberación de calcio. En concentraciones bajas de calcio citoplasmática ( $< 0,1$   $\mu M$ ) el  $Mg^{2+}$  compete con el  $Ca^{2+}$  por el sitio activador de alta afinidad. En concentraciones más altas de calcio ( $> 10$   $\mu M$ ), el  $Mg^{2+}$  se une al sitio inhibitorio que también une  $Ca^{2+}$  y es responsable de la inhibición observada en concentraciones milimolares de  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  (Meissner y cols., 1986; Laver y cols., 1997). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la oxidación y reducción de las vesículas modifica el efecto de  $Mg^{2+}$  sobre el canal RyR. Esto se evidenció por los cambios observados en la magnitud y duración del primer evento de liberación inducido por cafeína y en las posteriores oscilaciones, comparado con vesículas nativas. En condiciones reductoras y cuando el canal está abierto en concentraciones altas de  $Ca^{2+}$  extravesicular (*peak* del primer evento de liberación inducido por cafeína), el  $Mg^{2+}$  se uniría al sitio de inhibición con mayor afinidad que en condiciones nativas (no reductoras), cerrando los canales y generando un primer evento de liberación de menor duración. En concentraciones altas de  $Mg^{2+}$  ( $> 1$  mM), éste no se disociaría del canal una vez que ya está cerrado, evitando así una posterior apertura del canal por cafeína y la generación de oscilaciones. Este último efecto sería consecuencia

de que en condiciones reductoras, la afinidad de  $Mg^{2+}$  por el sitio de activación de  $Ca^{2+}$  (sitio de alta afinidad) también está aumentada, al igual que la afinidad por el sitio de inhibición. En condiciones oxidantes ocurriría lo inverso, ya que disminuye la afinidad del  $Mg^{2+}$  tanto por los sitios de activación como por los sitios de inhibición de  $Ca^{2+}$ .

En resumen, los resultados obtenidos indican que al modificar con agentes redox el sitio inhibitorio para  $Mg^{2+}$ , cambia marcadamente la respuesta de liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por cafeína en todas las concentraciones de  $Mg^{2+}$  probadas.

Además, observamos que los agentes oxidantes sólo en concentraciones muy elevadas disminuyen la velocidad de captación de la bomba de calcio. Este efecto puede deberse a una oxidación directa de los grupos sulfhidrilos presentes en la Ca-ATPasa. En las concentraciones de agentes oxidantes y de agentes reductores utilizadas para estudiar los efectos de  $Mg^{2+}$ , la velocidad de la bomba no se afectó. Por lo tanto, los resultados obtenidos se deben probablemente a la proteína canal, ya sea por oxidación o reducción directa del RyR o de otras proteínas que interactúan con él.

Liu y Pessah (1994) demostraron que el receptor de ryanodina y triadina forman un complejo de alto peso molecular en condiciones que activan el canal RyR. Este complejo lo visualizaron con SDS-PAGE en ambientes no reductores. Al reducir el complejo con  $\beta$ -mercaptoetanol o ditioneitol se separaron sus componentes RyR y triadina. También utilizaron la sonda CPM (maleimida 7-dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilcumarina) que, en condiciones que favorecen el cierre del canal, selectivamente formó aductos fluorescentes con sulfhidrilos hiperreactivos localizados en el RyR y en la triadina (Liu y cols., 1994).

En las vesículas de RS enriquecidas en triadas utilizadas en esta tesis, preincubadas con activadores del canal RyR como cafeína 5 mM y  $\text{Ca}^{2+}$  20  $\mu\text{M}$ , también se observó la formación de un complejo de alto peso molecular, en condiciones no reductoras. En cambio, con una preincubación en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  10 mM, no se visualizó dicho complejo. Al utilizar vesículas que se prepararon en presencia del agente reductor ditiotritol, no se detectó la formación del complejo en condiciones de activación ni de inhibición del canal. Tampoco se visualizó el complejo al reducir las vesículas que previamente habían sido incubadas con cafeína en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  micromolar. Entre las proteínas que forman el complejo se identificó al RyR, según se determinó por inmunoblots (resultados no mostrados).

Estos antecedentes evidencian la existencia de un complejo funcionalmente importante entre el RyR y la triadina, cuya estabilidad está determinada por el estado redox de sulfhidrilos hiperreactivos. Estos grupos SH son alostéricamente regulados por ligandos fisiológicos y farmacológicos del canal.

### **Efecto de cafeína sobre la liberación de calcio**

El efecto de cafeína sobre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  dependió de su concentración. Un aumento de [cafeína] aumentó la cantidad de calcio liberada y la duración de  $T_L$ , lo que indica que aumentó tanto la fracción de canales abiertos como la duración de la apertura de estos canales. Además, sólo con cafeína entre 0,5 y 4 mM se observaron oscilaciones regulares. En concentraciones menores a 0,5 mM no se observaron oscilaciones; entre 6 y 8 mM las oscilaciones fueron irregulares y en concentraciones aun mayores de cafeína, las oscilaciones se anularon completamente. Puesto que se ha reportado que con cafeína

5 mM ya se inhibe la Ca-ATPasa (Allen y Westerblad, 1995), podemos inferir que tanto el primer evento transitorio de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  como las subsecuentes oscilaciones observadas con cafeína entre 0,5 y 4 mM, ocurren por un efecto sobre el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ /RyR sin interferencia de la bomba de calcio. Por otro lado, con cafeína en bajas concentraciones ( $< 0,5$  mM) y en presencia continua de  $\text{Mg}^{2+}$ , sólo se observó el primer evento de liberación transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin posteriores oscilaciones. Esto indica que en concentraciones bajas de cafeína, los canales una vez cerrados por  $\text{Mg}^{2+}$  no vuelven a abrirse para generar oscilaciones.

Al modificar  $[\text{Mg}^{2+}]$  se observó que a bajas concentraciones los canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  son más sensibles a la presencia de cafeína. A medida que disminuye  $[\text{Mg}^{2+}]$ , el aumento de cafeína produce un mayor aumento en la constante inicial de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , obteniéndose una  $k_{\text{máx}}$  mayor, lo que indica que la fracción de canales abiertos es más elevada en bajo  $\text{Mg}^{2+}$ . La constante de Hill ( $K_{0,5}$ ) para cafeína aumentó junto con  $[\text{Mg}^{2+}]$ , indicando que para abrir el 50 % de los canales se necesita una mayor concentración de cafeína a medida que aumenta  $[\text{Mg}^{2+}]$ . En concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  fisiológicas (0,5-1,0 mM), el efecto de cafeína fue cooperativo ( $n_{\text{Hill}} = 1,7-1,9$ ) y en concentraciones altas de  $\text{Mg}^{2+}$  (2,5 mM) la cooperatividad aumentó notablemente ( $n_{\text{Hill}} = 2,9$ ). Con este aumento de cooperatividad, la unión de  $\text{Mg}^{2+}$  a sus sitios produjo una disminución aun mayor en  $k_{\text{máx}}$ , lo que indica que la fracción de canales abiertos disminuyó considerablemente. No obstante este aumento de cooperatividad, la cafeína es capaz de abrir los canales y producir liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en  $[\text{Mg}^{2+}]$  tan elevada como 2,5 mM.

Si suponemos que en todas las concentraciones de  $Mg^{2+}$ , la  $k_{m\acute{a}x}$  debiera llegar al mismo valor como en  $Mg^{2+}$  bajos o sin  $Mg^{2+}$  en una concentración elevada de cafeína; entonces, podemos ajustar los datos fijando la  $k_{m\acute{a}x}$  al valor obtenido en la concentración de  $Mg^{2+}$  más baja utilizada, 0,05 mM. Con este ajuste, la constante de Hill ( $K_{0,5}$ ) para cafeína aumentó considerablemente al aumentar el  $Mg^{2+}$  y la cooperatividad se mantuvo relativamente constante (1,7 a 1,9). Con los antecedentes disponibles es difícil priorizar por alguno de los dos ajustes utilizados, ya que no es posible discernir qué ocurrirá en concentraciones muy altas de cafeína. En concentraciones altas, cafeína inhibe la bomba de calcio y además, no es posible realizar experimentos en concentraciones muy elevadas debido a problemas de dilución en las jeringas del fluorímetro de flujo detenido. No obstante, con ambos ajustes se confirma que el efecto de cafeína sobre el canal RyR depende estrechamente de  $[Mg^{2+}]$  libre presente en el medio extravesicular (citosólico).

### **Participación de calsecuestrina en el proceso de liberación de calcio**

Las vesículas de RS de músculo esquelético de conejo enriquecidas en triadas tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de  $Ca^{2+}$  (Donoso y cols., 1996). Los resultados de esta tesis muestran que esta propiedad se perdió en las vesículas desprovistas de calsecuestrina. Estas vesículas sin calsecuestrina sólo captaron pasivamente ~20% del total del  $Ca^{2+}$  que acumularon las vesículas control. Esto sugiere que en las vesículas nativas equilibradas con  $Ca^{2+}$  3 mM, ~80% del  $Ca^{2+}$  intravesicular está unido a calsecuestrina y ~20% se encuentra en su forma libre.

Por otro lado, las vesículas sin calsecuestrina acumularon activamente  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extravésicular (citoplásmico), que fue liberable por cafeína y  $\text{ATP}^{2-}$ . La cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulada activamente también fue comparativamente menor en las vesículas sin calsecuestrina que en las vesículas control. Además, el tiempo de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en vesículas sin calsecuestrina y en vesículas control fue mayor que en vesículas nativas. Es probable que las vesículas tratadas hayan sufrido algún daño en su estructura durante el proceso de extracción de calsecuestrina y en el tratamiento de las vesículas control, que hace que la captación sea más lenta. Es notable que a pesar de estos procedimientos, las vesículas conserven los elementos necesarios y la capacidad para acumular  $\text{Ca}^{2+}$  y responder a agonistas para liberarlo. Los resultados obtenidos indican que las vesículas sin calsecuestrina acumularon  $\text{Ca}^{2+}$  activamente en forma más lenta que las vesículas control, lo que queda en evidencia al comparar ambas preparaciones a una misma concentración de proteínas. En concentraciones de proteínas más altas, las vesículas sin calsecuestrina acumularon  $\text{Ca}^{2+}$  en tiempos comparables con las vesículas control. Estos datos confirman reportes previos (Ikemoto y cols., 1972, 1974; MacLennan y Wong, 1971) indicando que calsecuestrina interviene y facilita el proceso de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  al actuar como tampón de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que al disminuir  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre al interior del RS favorecería la captación por medio de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

El evento de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por cafeína en las vesículas sin calsecuestrina, en una concentración de proteínas de 0,2 mg/mL, no se evidenció en una celda espectrofotométrica; en cambio, se observó claramente en un espectrofluorímetro de flujo detenido. Es probable que estas diferencias se fundamenten en el hecho de que durante el tiempo de mezcla del espectrofluorímetro Fluoro Max-2 ocurran los eventos

de liberación y captación de calcio y no se visualicen en el registro porque la señal es pequeña. Los experimentos realizados en este fluorímetro tuvieron un tiempo de mezcla de 2-3 segundos y los datos se recogieron cada 250 ms. En el espectrofotómetro de flujo detenido el tiempo de mezcla fue de 1-1,5 ms y se recogieron puntos cada 1 ó cada 2 ms, de acuerdo al tiempo total de registro de cada experimento. Como la señal correspondiente a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  es posterior a este tiempo de mezcla, pudo visualizarse claramente.

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por cafeína tuvo una cinética más lenta en las vesículas desprovistas de calsecuestrina, con una constante de velocidad (k) que sólo alcanzó la mitad del valor de k registrado en vesículas control. Además, en las vesículas sin calsecuestrina una fracción de canales comenzó a cerrarse a los 250 ms de iniciada la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , como lo indica la disminución de la señal de fluorescencia producto de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de estas vesículas a partir de los 250 ms. En contraste, en las vesículas control la liberación neta de  $\text{Ca}^{2+}$  fue más prolongada. A los 5 segundos de iniciada la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por cafeína los canales continuaban abiertos sin visualizarse aun una recaptación neta de calcio hacia el interior de las vesículas.

Estos resultados permiten señalar que la calsecuestrina tiene un papel activo en la regulación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  que estaría dado no sólo por sus propiedades tampón que le permiten acumular grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del RS, sino que también por una acción directa sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  disponible para ser liberado luego de una activación del canal. Esto sugiere que al no estar presente la calsecuestrina, no se

dispondría de una cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  para ser liberada con un tiempo medio rápido y de duración suficientes acorde con las exigencias fisiológicas del músculo esquelético.

A las vesículas depletadas de calsecuestrina se les incorporó calsecuestrina (datos no mostrados). Estas vesículas captaron muy poco  $\text{Ca}^{2+}$  y en forma muy lenta. Además, no se obtuvo una cinética de captación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  como en las vesículas que tienen la calsecuestrina incorporada en forma nativa. Por el contrario, el comportamiento fue similar a los obtenidos con las vesículas sin calsecuestrina. Es probable que la calsecuestrina se haya asociado en forma externa a las vesículas y al no tener a la calsecuestrina en su interior, ésta no estaría ejerciendo su papel de tampón de  $\text{Ca}^{2+}$  y de regulador tanto de la captación como de la liberación que ejerce desde el lumen de las vesículas nativas. También es posible que parte de la calsecuestrina efectivamente haya ingresado a las vesículas pero en cantidades insuficientes como para formar la red característica que forma esta proteína en las proximidades del canal de liberación. La calsecuestrina al no adquirir la conformación nativa no podría experimentar cambios conformacionales al unir y disociar  $\text{Ca}^{2+}$  luego de la captación y posterior liberación, y ejercer así los efectos regulatorios esperados sobre el canal de liberación de calcio.

#### **Cambios de fluorescencia intrínseca asociados a la unión de calcio a calsecuestrina y cinética de la disociación del calcio unido**

De antecedentes previos se sabe que la calsecuestrina experimenta cambios conformacionales al unir  $\text{Ca}^{2+}$  que se reflejan, entre otros parámetros, en un aumento en

su fluorescencia intrínseca debido a la internalización de grupos triptófanos (Ikemoto y cols., 1974; Ostwald y MacLennan, 1974; Mitchell y cols., 1988; Hidalgo y cols., 1996).

En esta tesis, las vesículas permeabilizadas de RS de músculo esquelético de conejo experimentaron cambios en su fluorescencia intrínseca en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , al igual que la calsecuestrina purificada. Estos cambios en la fluorescencia intrínseca no se observaron en una preparación de retículo sarcoplasmático longitudinal que no posee calsecuestrina. Tampoco se observaron en una preparación de vesículas de RS nativas sin antes incubar estas vesículas con  $\text{Ca}^{2+}$ . La incubación permite el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a las vesículas y el posterior aumento de la fluorescencia intrínseca tras la unión de este ion a calsecuestrina. Los resultados indican que calsecuestrina en su ambiente nativo al unir  $\text{Ca}^{2+}$  experimenta cambios conformacionales que se manifiestan con un aumento en la fluorescencia intrínseca. Estos cambios pudieron distinguirse en una preparación vesicular, a pesar de que la fluorescencia basal es mucho más alta que la fluorescencia intrínseca basal de la proteína purificada.

Para los estudios cinéticos de la disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  unido a calsecuestrina se utilizó una preparación de membranas de la zona de unión del RS (JFM) que presentó algunas ventajas fundamentales respecto a las vesículas de RS permeabilizadas. Los resultados de experimentos realizados en JFM fueron reproducibles a diferencia de los experimentos cinéticos realizados en vesículas de RS permeabilizadas. Creemos que esto se debe a que las JFM son membranas rotas producto del procedimiento de preparación, lo que permitiría un acceso expedito a la gran cantidad de calsecuestrina que las JFM poseen. Además, las JFM exhibieron una mayor diferencia en los cambios de

fluorescencia intrínseca en presencia y en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que otorgó una mayor sensibilidad a la medición.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  unido a calsecuestrina fue más rápida que los cambios de fluorescencia intrínseca asociados, tanto en la proteína en solución como cuando calsecuestrina estaba asociada a membranas. Esto indica que el cambio estructural de la calsecuestrina ocurre con un retardo temporal luego de la disociación de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La cinética de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  unido a calsecuestrina fue diferente en la proteína en solución y en la proteína asociada a membranas. El  $\text{Ca}^{2+}$  unido a calsecuestrina asociada a las JFM se disoció con una constante de velocidad 9,5 veces mayor que lo registrado en la proteína en solución. Los cambios de fluorescencia intrínseca asociados a la disociación de  $\text{Ca}^{2+}$  también fueron más rápidos en las JFM, presentando valores de  $k$  8,5 veces más altos que en calsecuestrina en solución. El hecho que la disociación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde calsecuestrina y los subsecuentes cambios de fluorescencia intrínseca fueron más rápidos cuando la calsecuestrina estaba aun unida a las JFM que en solución, sugiere que cuando la calsecuestrina está presente en altas concentraciones en un espacio restringido, tal como las JFM, la disociación es un evento cooperativo.

### **Implicaciones fisiológicas**

La liberación transitoria y parcial de  $\text{Ca}^{2+}$  seguida por oscilaciones luego de la adición de cafeína en  $[\text{Mg}^{2+}]$  libre 0,1 ó 0,5 mM,  $[\text{ATP}^{2-}]$  libre 0,15 mM,  $[\text{Ca}^{2+}]$  100 nM, cercanas a sus respectivas concentraciones fisiológicas de reposo, concuerda con

resultados previos obtenidos en músculo esquelético intacto de mamífero. En fibras rápidas intactas de mamífero, la cafeína en concentraciones tan altas como 30 mM no fue suficiente para vaciar completamente el RS en  $[Mg^{2+}]$  1 mM (Fryer y Stephenson, 1996). Es necesario aplicar cafeína en una solución con una baja concentración de  $Mg^{2+}$  para vaciar completamente el RS (Kabbara y Stephenson, 1994). Por otro lado, se sabe que cafeína aumenta la sensibilidad a  $Ca^{2+}$  por el sitio de activación (Rousseau y cols., 1988; Moutin y Dupont, 1988; Meissner y cols., 1997), pero no está claro su efecto sobre el sitio de inhibición. Tampoco se sabe si cafeína afecta la afinidad para  $Mg^{2+}$  del sitio de activación o del sitio de inhibición en mamíferos, sólo se ha demostrado en anfibios que cafeína disminuye levemente la afinidad para  $Mg^{2+}$  del sitio inhibitorio sin modificar la afinidad en el sitio de activación de  $Ca^{2+}$  (Murayama y cols., 2000). Los presentes resultados proporcionan una explicación al efecto de liberación parcial de cafeína observado en células de músculo esquelético completo. El efecto de liberación parcial y oscilatorio ocurriría por una competencia entre cafeína y  $[Mg^{2+}]$  libre para abrir y cerrar los canales, respectivamente. Cafeína abre los canales RyR, pero el RS libera sólo una cantidad discreta de  $Ca^{2+}$  puesto que  $Mg^{2+}$  cierra los canales aun en la continua presencia de cafeína. El  $Ca^{2+}$  liberado es captado rápidamente al RS por la Ca-ATPasa. Esto genera una apertura transitoria de los canales. En presencia de  $Mg^{2+}$  0,5-1,0 mM la liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por cafeína seguirá siendo transitoria aun en ambientes oxidantes donde la afinidad de  $Mg^{2+}$  por su sitio ha disminuído, aunque no se desarrollarían oscilaciones. Sólo cuando  $[Mg^{2+}]$  es muy baja y en un ambiente oxidante, la liberación de calcio ya no sería transitoria y el RS podría depletarse aun con una baja concentración de cafeína. Si una situación similar se aplica para la apertura de los

canales por agonistas fisiológicos, el potencial para las oscilaciones estaría presente en músculo esquelético de mamífero intacto ya que las oscilaciones se generan por un mecanismo que se origina desde los canales RyR del músculo esquelético.

Los agentes redox pueden oxidar o reducir tanto la proteína canal como también otras proteínas presentes en la triada que poseen grupos sulfhidrilos, como triadina y juntina, y que están en estrecho contacto con calsequestrina y con el RyR. No obstante, es probable que el efecto de los agentes redox sobre la afinidad del sitio inhibitorio para  $Mg^{2+}$  presente en el canal de  $Ca^{2+}$  ocurra por una oxidación de los grupos tioles de la proteína canal.

Existen evidencias que sugieren que grupos SH presentes en el RyR pueden cambiar su estado redox durante la actividad normal del canal (Liu y cols., 1994). Por otra parte se ha propuesto que la activación fisiológica de los canales RyR por los sensores de voltaje del T-T involucra un aumento de la afinidad del sitio inhibitorio de  $Mg^{2+}$  (Lamb y Stephenson, 1991, 1992, 1994; Lamb y Laver, 1998). Los resultados de esta tesis muestran que la oxidación de grupos SH aumenta tanto la magnitud como la duración del evento de liberación de calcio. No obstante, no se ha demostrado que *in vivo* los canales RyR se oxiden durante la activación fisiológica por los sensores de voltaje.

En el músculo esquelético, se ha estimado que los niveles de glutatión son de 1 a 3 mM (Sen, 1995; Ji y cols., 1992), mientras que la razón GSH/GSSG en el citosol de una célula de mamífero típica es  $\geq 30:1$ , lo que mantiene un potencial redox de aproximadamente  $-220$  mV (Hwang, 1992). El potencial redox del lumen del retículo endoplasmático es significativamente más oxidado (aproximadamente  $-180$  mV) y se

mantiene con una razón 3:1 a 1:1 de GSH/GSSG (Hwang, 1992; Bánhegyi y cols., 1999). Es probable que la razón GSH/GSSG en el RS sea similar a la determinada en el retículo endoplasmático. De esta manera, la membrana donde el RyR reside está sujeta a una gran diferencia de potencial redox transmembrana de 40-50 mV, con el lumen mucho más oxidado que el citosol. En la célula muscular, el estrés oxidativo inducido por radicales libres derivados de oxígeno, puede oxidar directamente grupos tioles de proteínas del RS (Fabero y cols., 1995; Stuart y cols., 1992) o provocar un desbalance de la relación citosólica GSH/GSSG, oxidando GSH a GSSG (Ji y cols., 1992). Por otra parte se ha observado un aumento de radicales libres en condiciones como hipertermia maligna (Duthie y Arthur, 1993) y reperfusión post-isquémica (Kaneko y cols., 1994). Si los radicales libres promueven la oxidación de grupos SH o aumentan la concentración de GSSG, entonces, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, la afinidad por  $Mg^{2+}$  estaría disminuida en estas condiciones, lo que favorecería una mayor liberación de calcio. Como consecuencia se produciría un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  citoplasmática, como se observa en las mencionadas patologías.

Respecto a la participación de calsecuestrina en el proceso de liberación de  $Ca^{2+}$ , los resultados de esta tesis extienden reportes previos en cuanto a la participación directa de esta proteína en la regulación del proceso de liberación de  $Ca^{2+}$ . Los resultados de esta tesis muestran que calsecuestrina fue fundamental tanto en el proceso de captación-acumulación de  $Ca^{2+}$ , como en el evento de su liberación. Si bien existen varios reportes dirigidos a mostrar la participación de calsecuestrina en estos procesos celulares, no existían reportes que demostraran que esta proteína es fundamental para obtener una cinética de liberación rápida de  $Ca^{2+}$  como lo requiere el músculo esquelético ni

tampoco se había reportado una cuantificación del proceso de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  unido a calsecuestrina.

Los resultados de esta tesis muestran que a 25 °C el tiempo medio de la disociación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde calsecuestrina formando parte de las JFM fue de 6,4 ms. Es probable que la disociación de  $\text{Ca}^{2+}$  sea aun más rápida a 37 °C. Estos resultados implican que la disociación de calcio desde calsecuestrina *in vivo* no es limitante de la velocidad de la liberación de calcio desde el RS.

## CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis muestran que en vesículas de retículo sarcoplasmático de conejo, enriquecidas en triadas, la cafeína induce liberación de calcio transitoria seguida de oscilaciones de calcio. Además, se demuestra que las oscilaciones de calcio también se producen en forma espontánea sin la adición de agonistas. Estos antecedentes indican que estas vesículas poseen todos los elementos requeridos para la generación de oscilaciones de calcio que previamente habían sido observadas sólo en células y en fibras musculares.

Los resultados de esta tesis indican también que la liberación de calcio inducida por cafeína en estas vesículas enriquecidas en triadas, disminuye por el aumento de  $[Mg^{2+}]$  libre. Esta inhibición es modulada por el estado redox de los canales RyR. Nuestros resultados no nos permiten descartar la participación de otras proteínas presentes en la triada que contienen grupos sulfhidrilos, como triadina y juntina, en el mecanismo de modulación por óxido-reducción. Sin embargo, se demuestra claramente que en la regulación de la liberación de calcio inducida por cafeína participa el(los) sitio(s) de unión para  $Mg^{2+}$ .

Por otra parte, hemos demostrado que calsecuestrina: 1) es fundamental en el proceso de acumulación-captación de calcio por el retículo, y 2) regula directamente el proceso de liberación de calcio inducido por agonistas como cafeína y  $ATP^{2-}$ .

Finalmente, nuestros resultados revelan por primera vez que la disociación del calcio unido a calsecuestrina tiene una cinética rápida que no es limitante del proceso de

liberación de calcio, lo que sugiere que el calcio unido a la calsecuestrina está rápidamente disponible para ser liberado luego que el canal RyR se abre por algún estímulo.

## REFERENCIAS

1. Aaron, B. M., Oikawa, K., Reithmeier, R. A. y Sykes, B. D. (1984) Characterization of skeletal muscle calsequestrin by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **259**: 11876-11881.
2. Aghdasi, B., Zhang, J. Z., Wu, Y. L., Reid, M. B. y Hamilton, S. L. (1997) Multiple classes of sulfhydryl modulate the skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *J. Biol. Chem.* **272**: 3739-3748.
3. Abramson, J. J., Zable, A. C., Favero, T. G. y Salama, G. (1995) Thimerosal interacts with the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**: 29644-29647.
4. Airey, J. A., Beck, C. F., Murakami, K., Tanksley, S. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H. y Sutko, J. L. (1990) Identification and localization of two triad junctional foot protein isoforms in mature avian fast twitch skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **265**: 14187-14194.
5. Allen, D. G. y Westerblad, H. (1995) The effect of caffeine on intracellular calcium, force and the rate of relaxation of mouse skeletal muscle. *J. Physiol.* **487**: 331-342.
6. Bánhegyi, G., Lusini, L., Puskás, F., Rossi, R., Fulceri, R., Braun, L., Mile, V., di Simplicio, P., Mandl, J. y Benedetti, A. (1999) Preferential transport of glutathione *versus* glutathione disulfide in rat liver microsomal vesicles. *J. Biol. Chem.* **274**: 12213-12216.
7. Beltrán, M., Bull, R., Donoso, P. e Hidalgo, C. (1996)  $\text{Ca}^{2+}$ - and pH-dependent halothane stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  release in sarcoplasmic reticulum from frog muscle. *Am. J. Physiol.* **271**: C540-C546.
8. Berchtold, M. W., Brinkmeier, H. y Müntener, M. (2000) Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological Reviews* **80**: 1215-1265.
9. Berridge, M. J. (1993) Cell signaling. A tale of two messengers. *Nature (Lond.)* **365**: 388-389.
10. Berridge, M. J., Bootman, M. D. y Lipp, P. (1998) Calcium – a life and death signal. *Nature (Lond.)* **395**: 645-648.

11. Bers, D. M. y Fill, M. (1998) Coordinated feet and the dance of ryanodine receptors. *Science*, **281**: 790-791.
12. Bianchi, C. P. (1997) Conformation state of the ryanodine receptor and functional effects of ryanodine on skeletal muscle. *Biochem. Pharmacol.* **53**: 909-912.
13. Block, B. A., Imagawa, T., Campbell, K. P. y Franzini-Armstrong, C. (1988) Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **107**: 2587-2600.
14. Brandt, N. R., Caswell, A. H., Brunschwig, J-P, Kang, J-J, Antoniu, B. e Ikemoto, N. (1992) Effects of anti-triadin antibody on  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **299**: 57-59.
15. Brandt, N. R., Caswell, A. H., Wen, S-R. y Talvenheimo, J. A. (1990) Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J. Membr. Biol.* **113**: 237-251.
16. Buck, E., Zimanyi, I., Abramson, J. J. y Pessah, I. N. (1992) Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J. Biol. Chem.* **267**: 23560-23567.
17. Bull, R. y Marengo, J. J. (1993) Sarcoplasmic reticulum release channels from frog skeletal muscle display two types of calcium dependence. *FEBS Lett.* **331**: 223-227.
18. Bull, R., Marengo, J., Suárez-Isla, B., Donoso, P., Sutko, J. e Hidalgo, C. (1989) Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum from frog muscle by nanomolar concentrations of ryanodine. *Biophys. J.* **56**: 749-756.
19. Cala, S. E. y Jones, L. R. (1983) Rapid purification of calsequestrin from cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles by  $Ca^{2+}$ -dependent elution from phenyl-sepharose. *J. Biol. Chem.* **258**: 11932-11936.
20. Calviello, G. y Chiesi, M. (1989) Rapid kinetics analysis of the calcium-release channels of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: the effect of inhibitors. *Biochemistry* **28**: 1301-1306.
21. Campbell, K. P., Franzini-Armstrong, C. y Shamo, A. (1980) Further characterization of light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. Identification of the sarcoplasmic reticulum feet associated with heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **602**: 97-116.

22. Campbell, K. P., MacLennan, D. H. y Jorgensen, A. O. (1983) Staining of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains all". *J. Biol. Chem.* **258**: 11267-11273.
23. Caswell, A. H., Brandt, N. R., Brunschwig, J. P. y Purkerson, S. (1991) Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95,000 protein (triadin) which binds the ryanodine receptor and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* **30**: 7507-7513.
24. Chen, S. R. W., Li, X., Ebisawa, K. y Zhang, L. (1997) Functional characterization of the recombinant type 3  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) expressed in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 24234-24246.
25. Clapham, D. E. (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268.
26. Collins, J. H. (1991) Sequence analysis of the ryanodine receptor: possible association with a 12K, FK506-binding immunophilin/protein kinase C inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 1288-1290.
27. Conti, A., Gorza, L. y Sorrentino, V. (1996) Differential distribution of ryanodine receptor type 3 (RyR3) gene product in mammalian skeletal muscles. *Biochem. J.* **316**: 19-23.
28. Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, N. y Vaughan, D. (1994) Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.* **266** (Cell Physiol. 35): C1485-C1504.
29. Costello, B., Chadwick, C., Saito, A., Chu, A., Maurer, A. y Fleischer, S. (1986) Characterization of the junctional face membrane from terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **103**: 741-753.
30. Cozens, B. y Reithmeier, R. A. F. (1984) Size and shape of rabbit skeletal muscle calsequestrin. *J. Biol. Chem.* **259**: 6248-6252.
31. Damiani, E. y Margreth, A. (1990) Specific protein-protein interactions of calsequestrin with junctional sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**: 1253-1259.
32. Damiani, E., Salvatori, S., Zorzato, F. y Margreth, A. (1986) Characteristics of skeletal muscle calsequestrin: comparison of mammalian, amphibian and avian muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **7**: 435-445.
33. Delay, M., Ribalet, B. y Vergara, J. (1986) Caffeine potentiation of calcium release in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **375**: 535-559.

34. Donoso, P. e Hidalgo, C. (1993) pH-sensitive calcium release in triads from frog skeletal muscle. Rapid filtration studies. *J. Biol. Chem.* **268**: 25432-25438.
35. Donoso, P., Prieto, H. e Hidalgo, C. (1995) Luminal calcium regulates calcium release in triads isolated from frog and rabbit skeletal muscle. *Biophys. J.* **68**: 507-515.
36. Donoso, P., Aracena, P. e Hidalgo, C. (2000) Sulfhydryl oxidation overrides  $Mg^{2+}$  inhibition of calcium-induced calcium release in skeletal muscle triads. *Biophys. J.* **79**: 279-286.
37. Donoso, P., Beltrán, M. e Hidalgo, C. (1996) Luminal pH regulates calcium release kinetics in sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochemistry* **35**: 13419-13425.
38. Dulhunty, A. F., Laver, D. R., Gallant, E. M., Casarotto, M. G., Pace, S. M. y Curtis, S. (1999) Activation and inhibition of skeletal RyR channels by a part of the skeletal DHPR II-III loop: effects of DHPR Ser<sup>687</sup> and FKBP12. *Biophys. J.* **77**: 189-203.
39. Duthie, G. G. y Arthur, J. R. (1993) Free radicals and calcium homeostasis: relevance to malignant hyperthermia? *Free Radic. Biol. Med.* **341**: 295-299.
40. El-Hayek, R., Antoniu, B., Wang, J. P., Hamilton, S. L. e Ikemoto, N. (1995) Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 22116-22118.
41. El-Hayek, R. e Ikemoto, N. (1998) Identification of the minimum essential region in the II-III loop of the dihydropyridine receptor  $\alpha_1$  subunit required for activation of skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *Biochemistry* **37**: 7015-7020.
42. Endo, M. (1977) Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* **57**: 71-108.
43. Eu, J. P., Sun, J. H., Xu, L. Stamler, J. S. y Meissner, G. (2000) The skeletal muscle calcium release channel: coupled  $O_2$  sensor and NO signaling functions. *Cell* **102**: 499-509.
44. Fabiato, A. y Fabiato, F. (1978) Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac cells. *J. Gen. Physiol.* **72**: 667-699.

45. Favero, T. G., Zable, A. C. y Abramson, J. J. (1995) Hydrogen peroxide stimulates the Ca release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**: 25557-25563.
46. Fill, M., Coronado, R., Mickelson, J. R., Vilven, J. Ma., Jacobson, B. A. y Louis, C. F. (1990) Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophys. J.* **50**: 471-475.
47. Fill, M. Stefani, E. y Nelson, T. E. (1991) Abnormal human sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channels in malignant hyperthermic skeletal muscle. *Biophys. J.* **59**: 1085-1090.
48. Fleischer, S. e Inui, M. (1989) Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**: 333-364.
49. Fleischer, S., Ogunbunmi, E. M., Dixon, M. C. y Fleer, E. A. M. (1985) Localization of Ca<sup>2+</sup> release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 7256-7259.
50. Fliegel, L., Ohnishi, M., Carpenter, M. R., Khanna, V. K. Reithmeier, R. A. F. y MacLennan, D. H. (1987) Amino acid sequence of rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1167-1171.
51. Franzini-Armstrong, C. y Jorgensen, A. O. (1994) Structure and development of E-C couplings units in skeletal muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **56**: 509-534.
52. Franzini-Armstrong, C., Kenny, L. J. y Varriano-Marston, R. (1987) The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J. Cell Biol.* **105**: 49-56.
53. Franzini-Armstrong, C. y Kish, J. W. (1995) Alternate disposition of tetrads in peripheral couplings of skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **16**: 319-324.
54. Franzini-Armstrong, C. y Nunzi, G. (1983) Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fibre. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**: 233-252.
55. Franzini-Armstrong, C. y Protasi, F. (1997) Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.* **77**: 699-729.
56. Fryer, M. y Stephenson, D. G. (1996) Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Physiol.* **493**: 357-370.

57. Fruen, B. R., Bardy, J. M., Byrem, T. M., Strasburg, G. M. y Louis, C. F. (2000) Differential  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin. *Am. J. Physiol.* **279**: C724-C733.
58. Fuentes, O., Valdivia, C., Vaughan, D., Coronado, R. y Valdivia, H. (1994) Calcium-dependent block of ryanodine receptor channel of swine skeletal muscle by direct binding of calmodulin. *Cell Calcium* **15**: 305-316.
59. Furuichi, T., Furutama, D., Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. y Mikoshiba, K. (1994) Multiple types of ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels are differentially expressed in rabbit brain *J. Neurosci.*, **14**: 4794-4805.
60. Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Reiken, S., Huang, F., Marx, S. O., Rosemblyt, N. y Marks, A. R. (2001) FKBP12 binding modulates ryanodine receptor channel gating. *J. Biol. Chem.* **276**: 16931-16935.
61. Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., Scrobogna, M. y Sorrentino, V. (1995) The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J. Cell Biol.*, **128**: 893-904.
62. Gilchrist, J. S. C., Belcastro, A. N. y Katz, S. (1992) Intraluminal  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of  $\text{Ca}^{2+}$  and ryanodine-mediated regulation of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release. *J. Biol. Chem.* **267**: 20850-20856.
63. Godt, R. E. y Maughan, D. W. (1988) On the composition of the cytosol of relaxed skeletal muscle of the frog. *Am. J. Physiol.* **254**: C591-C604.
64. Guo, W., Jorgensen, A. O., Jones, L. R. y Campbell, K. P. (1996) Biochemical characterization and molecular cloning of cardiac triadin. *J. Biol. Chem.* **271**: 458-465.
65. Guo, W. y Campbell, K. P. (1995) Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**: 9027-9030.
66. Gurrola, G. B., Arevalo, C., Sreekumar, R., Lokuta, A. J., Walker, J. W. y Valdivia, H. H. (1999) Activation of ryanodine receptors by imperatoxin a and a peptide segment of the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* **274**: 7879-7886.
67. Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. e Imoto, K. (1992) Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* **312**: 229-235.
68. Herrmann-Frank, A. (1989) Caffeine and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mechanical oscillations in isolated skeletal muscle of the frog. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **10**: 437-445.

69. Herrmann-Frank, A. y Lehmann-Horn, F. (1996) Regulation of the purified  $\text{Ca}^{2+}$  release channel/ryanodine receptor complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by luminal calcium. *Pflügers Arch.* **432**: 155-157.
70. Herrmann-Frank, A. Lüttgau, H.-C. y Stephenson, G. (1999) Caffeine and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: a stimulating story. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **20**: 223-237.
71. Herrmann-Frank, A. y Meissner, G. (1989) Isolation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing factor from caffeine-treated muscle fibres and its effect on  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **20**: 223-237.
72. Hidalgo, C., Donoso, P. y Rodríguez, P. H. (1996) Protons induce calsequestrin conformational changes. *Biophys. J.* **71**: 2130-2137, 1996.
73. Hidalgo, C., Jorquera, J., Tapia, V. y Donoso, P. (1993) Triads and transverse tubules isolated from skeletal muscle contain high levels of inositol 1,4,5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* **268**: 15111-15117.
74. Hwang, C., Sinskey, A. J. y Lodish, H. F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in endoplasmic reticulum. *Science* **257**: 1496-1502.
75. Ikemoto, N., Bhatnagar, G. M., Nagy, B. y Gergely, J. (1972) Interaction of divalent cations with the 55,000-dalton protein component of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **247**: 7835-7837.
76. Ikemoto, N., Nagy, B., Bhatnagar, G. M. y Gergely, J. (1974) Studies on a metal-binding protein of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **249**: 2357-2365.
77. Ikemoto, N., Ronjat, M., Mészáros, L. G. y Koshita, M. (1989) Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* **28**: 6764-6771.
78. Ikemoto, N., Antoniu, B., Kang, J-J, Mészáros, L. G. y Ronjat, M. (1991) Intravesicular calcium transient during calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* **30**: 5230-5237.
79. Ikemoto, N. Iino, M. y Endo, M. (1995) Enhancing effect of calmodulin on  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **487**: 573-582.
80. Ikemoto, N. Iino, M. y Endo, M. (1996) Effect of calmodulin antagonists on calmodulin-induced biphasic modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 690-694.

81. Inesi, G. (1985) Mechanism of calcium transport. *Ann. Rev. Physiol.* **47**: 573-603.
82. Inui, M., Saito, A. y Fleischer, S. (1987) Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **262**: 1740-1747.
83. Jarayaman, T., Brillantes, A. M., Timerman, A. P. Fleischer, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. y Marks, A. R. (1992) FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* **267**: 9474-9477.
84. Ji, L. L. Fu, R. y Mitchell, E. W. (1992) Glutathione and antioxidant enzyme in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* **73**: 1854-1859.
85. Jones, L. R., Suzuki, Y. J., Wang, W., Kobayashi, Y. M., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C., Cleemann, L. y Morad, M. (1998) Regulation of  $Ca^{2+}$  signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J. Clin. Invest.* **101**: 1385-1393.
86. Jones, L. R., Zhang, L., Sanborn, K., Jorgensen, A. O. y Kelley, J. (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**: 30787-30796.
87. Jorgensen, A. O., Kalnins, V. K. y MacLennan, D. H. (1979) Localization of sarcoplasmic reticulum proteins in rat skeletal muscle by immunofluorescence. *J. Cell. Biol.* **80**: 372-384.
88. Jorgensen, A. O., Shen A. C-Y., Campbell, K. P. y MacLennan, D. H. (1983) Ultrastructural localization of calsequestrin in rat skeletal muscle by immunoferritin labelling of ultrathin frozen sections. *J. Cell. Biol.* **80**: 372-384.
89. Kabbara, A. A. y Stephenson, D. G. (1994) Effects of  $Mg^{2+}$  on  $Ca^{2+}$  handling by the sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal and cardiac muscle fibres. *Pflügers Arch.* **428**: 331-339.
90. Kaneko, M., Matsumoto, Y., Hayashi, H., Kobayashi, A. y Yamazaki, N. (1994) Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart. *Mol. Cell Biochem.* **139**: 91-100.
91. Kawasaki, T. y Kasai, M. (1994) Regulation of calcium channel in sarcoplasmic reticulum by calsequestrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 1120-1127.

92. Kim, K. C., Caswell, A. H., Talvenheimo, J. A. y Brandt, N. R. (1990) Isolation of a terminal cisternae protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry* **29**: 9281-9289.
93. Kim, D. H., Ohnishi, S. T. e Ikemoto, N. (1983) Kinetics studies of calcium release from sarcoplasmic reticulum in vitro. *J. Biol. Chem.* **258**: 9662-9668.
94. Kirino, Y., Osakabe, M. y Shimizu, H. (1983)  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from fragmented sarcoplasmic reticulum:  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent passive  $\text{Ca}^{2+}$  efflux. *J. Biochem.* **94**: 1111-1118.
95. Knudson, C. M., Stang, K. K., Moomaw, C. R., Slaughter, C. A. y Campbell, K. P. (1993) Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J. Biol. Chem.* **268**: 12646-12654.
96. Konishi, M., Suda, N., Kurihara, S. (1993) Fluorescence signals from the  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  indicator fura-2 in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* **64**: 223-239.
97. Kumbaraci, N. M. y Nastuk, W. L. (1982) Action of caffeine in excitation-contraction coupling of frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **325**: 195-211.
98. Kuwajima, G., Futatsugi, A., Niinobe, M., Nakanishi, S. y Mikoshiba, K. (1992) Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. *Neuron* **9**: 1133-1142.
99. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685, 1970.
100. Lai, F. A., Dent, M., Wickenden, C., Xu, L., Kumari, G., Misra, M., Lee, H. B., Sar, M. y Meissner, G. (1992a) Expression of a cardiac  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel isoform in mammalian brain. *Biochem. J.* **288**: 553-564.
101. Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., Liu, Q. Y. y Meissner, G. (1988) Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature (London)* **331**: 315-319.
102. Lai, F. A., Liu, Q. Y., Xu, L., El-Hashem, A., Kramarcy, N. R., Sealock, R. y Meissner, G. (1992b) Amphibian ryanodine receptor isoforms are related to those of mammalian skeletal or cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* **263** (*Cell Physiol.* 32): C365-C372.
103. Lai, F. A., Misra, M., Xu, L., Smith, H. A. y Meissner, G. (1989) The ryanodine receptor- $\text{Ca}^{2+}$  release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic

- reticulum. Evidence for a cooperatively coupled, negatively charged homotetramer. *J. Biol. Chem.* **264**: 16776-16785.
104. Lamb, G. D. (2000) Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**: 216-224.
  105. Lamb, G. D. y Laver, D. R. (1998) Adaptation, inactivation and inhibition in ryanodine receptors. *In The Structure and Function of Ryanodine Receptors*. R. Sitsapesan y A. J. Williams, editors. Imperial College Press, UK. 269-290.
  106. Lamb, G. D. y Stephenson, D. G. (1991) Effect of  $Mg^{2+}$  on the control of  $Ca^{2+}$  release in skeletal muscle fibres of the toad. *J. Physiol.* **434**: 507-528.
  107. Lamb, G. D. y Stephenson, D. G. (1992) Importance of  $Mg^{2+}$  in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *News in Physiological Sciences.* **7**: 270-274.
  108. Lamb, G. D. y Stephenson, D. G. (1994) Effects of intracellular pH and  $[Mg^{2+}]$  on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the rat. *J. Physiol.* **478**: 331-339.
  109. Lau, Y. H., Caswell, A. H. y Brunschwig, J-P. (1977) Isolation of transverse tubules by fractionation of triad junctions of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **252**: 5565-5574.
  110. Laver, D. R., Baynes, T. M. y Dulhunty, A. F. (1997) Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: evidence for two independent mechanisms. *J. Membr. Biol.* **156**: 213-229.
  111. Ledbetter, M. W., Preiner, J. K., Louis, C. F. y Mickelson, J. R. (1994) Tissue distribution of ryanodine receptor isoforms and alleles determined by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* **269**: 31544-31551.
  112. Lee, Y. S., Ondrias, K., Duhl, A. J., Ehrlich, B. E. y Kim, D. H. (1991) Comparison of calcium release from sarcoplasmic reticulum of slow and fast twitch muscles. *J. Membr. Biol.* **122**: 155-163.
  113. Leong, P. y MacLennan, D. H. (1998a) Complex interactions between skeletal muscle ryanodine receptor and dihydropyridine receptor proteins. *Biochem. Cell Biol.* **76**: 681-694.
  114. Leong, P. y MacLennan, D. H. (1998b) The cytoplasmic loops between domains II and III and domains III y IV in the skeletal muscle dihydropyridine receptor bind to a contiguous site in the skeletal muscle ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **273**: 29958-29964.

115. Liu, G., Abramson, J. J., Zable, A. C. y Pessah, I. N. (1994) Direct evidence for the existence and functional role of hyperreactive sulfhydryls on the ryanodine receptor-triadin complex selectively labeled by the coumarin maleimide 7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin. *Mol. Pharmacol.* **45**: 189-200.
116. Liu, G. y Pessah (1994) Molecular interaction between ryanodine receptor and glycoprotein triadin involves redox cycling of functionally important hyperreactive sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* **269**: 33028-33034.
117. Liu, Q. Y., Lai, F. A., Rousseau, E., Jones, R. V. y Meissner, G. (1989) Multiple conductance states of the purified calcium release channel complex from skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* **55**: 415-424.
118. Lu, X., Xu, L. y Meissner, G. (1994) Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 6511-6516.
119. Ma, J., Bhat, M. B. y Zhao, J. (1995) Rectification of skeletal muscle ryanodine receptor mediated by FK506 binding protein. *Biophys. J.* **69**: 2398-2404.
120. Ma, J., Fill, M., Knudson, C. M., Campbell, K. P. y Coronado, R. (1988) Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel. *Science* **242**: 99-102.
121. MacLennan, D. H. y Wong, P. T. S. (1971) Isolation of a calcium sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**: 1231-1235.
122. McPherson, P. S. y Campbell, K. P. (1993) The ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *J. Biol. Chem.* **268**: 13765-13768.
123. Marengo, J. J., Hidalgo, C. y Bull, R. (1998) Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells. *Biophys. J.* **74**: 1263-1277.
124. Marx, S. O., Ondrias, K. y Marks, A. R. (1988) Coupled gating between individual skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channels (ryanodine receptors). *Science* **281**: 818-821.
125. Meissner, G. (1975) Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **389**: 51-68.
126. Meissner, G. (1984) Adenine nucleotide stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **159**: 1365-1374.

127. Meissner, G. (1986a) Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* **25**: 244-251.
128. Meissner, G. (1986b) Ryanodine activation and inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **261**: 6300-6306.
129. Meissner, G. (1994) Ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* **56**: 485-508.
130. Meissner, G., Darling, E. y Eveleth, J. (1986) Kinetics of rapid  $\text{Ca}^{2+}$  release by sarcoplasmic reticulum. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and adenine nucleotides. *Biochemistry* **25**: 236-244.
131. Meissner, G. y El-Hashem, A. (1992) Ryanodine as a functional probe of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *Mol. Cell. Biochem.* **114**: 119-123.
132. Meissner, G., Rios, E., Tripathy, A. y Pasek, D. A. (1997) Regulation of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) by  $\text{Ca}^{2+}$  and monovalent cations and anions. *J. Biol. Chem.* **272**: 1628-1638.
133. Melzer, W., Herrmann-Frank, A. y Lüttgau, H. Ch. (1995) The role of  $\text{Ca}^{2+}$  ions on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**: 59-116.
134. Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S. y Numa, S. (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature (London)* **340**: 230-233.
135. Mitchell, R. D., Palade, P. y Fleischer, S. (1983) Morphology of isolated triads. *J. Cell Biol.* **96**: 1017-1029.
136. Mitchell, R. D., Simmerman, H. K. B. y Jones, L. R. (1988)  $\text{Ca}^{2+}$  binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J. Biol. Chem.* **263**: 1376-1381.
137. Moore, C. P., Zhang, J. Z. y Hamilton, S. L. (1999) A role for cysteine 3635 of RyR1 in redox modulation and calmodulin binding. *J. Biol. Chem.* **274**: 36831-36834.
138. Moutin, M. J. y Dupont, Y (1988) Rapid filtration studies of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from skeletal sarcoplasmic reticulum. Role of monovalent ions. *J. Biol. Chem.* **263**: 4228-4235.

139. Murayama, T. y Ogawa, Y. (1992) Purification and characterization of two ryanodine-binding protein isoforms from sarcoplasmic reticulum of bullfrog skeletal muscle. *J. Biochem.* **112**: 514-522.
140. Murayama, T., Kurebayashi, N. y Ogawa, Y. (2000) Role of  $Mg^{2+}$  in  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release through ryanodine receptors of frog skeletal muscle: modulations by adenine nucleotides and caffeine. *Biophys. J.* **78**: 1810-1824.
141. Murray, B. E. y Ohlendieck, K. (1998) Complex formation between calsequestrin and the ryanodine receptor in fast- and slow- twitch rabbit skeletal muscle. *FEBS Letters.* **429**: 317-322.
142. Nagasaki, K. y Kasai, M. (1983) Fast release of calcium from sarcoplasmic reticulum vesicles monitored by chlortetracycline fluorescence. *J. Biochem.* **94**: 1101-1109.
143. Nakai, J., Imagawa, T., Hakamata, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H. y Numa, S. (1990) Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett.* **271**: 169-177.
144. Nakai, J., Sekiguchi, N., Rando, T. A., Allen, P. y Beam, K. (1998a) Two regions of the ryanodine receptors involved in coupling with L-type  $Ca^{2+}$  channels. *J. Biol. Chem.* **273**: 13403-13406.
145. Nakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B. y Beam, K. G. (1998b) Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *J. Biol. Chem.* **273**: 24983-24986.
146. Nelson, T. E. y Nelson, K. E. (1990) Intra- and extraluminal sarcoplasmic reticulum membrane regulatory sites for  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release. *FEBS Lett.* **263**: 292-294.
147. Neylon, C. B., Richards, S. M., Larsen, M. A., Agrotis, A. y Bobik, A. (1995) Multiple types of ryanodine receptor/ $Ca^{2+}$  release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**: 814-821.
148. O'Brien, J., Meissner, G. y Block, B. A. (1993) The fastest contracting muscles of nonmammalian vertebrates express only one isoform of the ryanodine receptor. *Biophys. J.* **65**: 2418-2427.
149. Ogawa, Y. (1994) Role of ryanodine receptors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**: 229-274.
150. Olivares, E. B., Tanksley, S. J., Airey, J. A., Beck, C. F., Ouyang, Y., Deerinck, T. J., Ellisman, L. H. y Sutko, J. L. (1991) Nonmammalian vertebrate skeletal

- muscle express two triad junctional foot protein isoforms. *Biophys J.* **59**: 1153-1163.
151. Ohkura, M., Furukawa, K.-I., Fujimori, H., Kuruma, A., Kawano, S., Hiraoka, M., Kuniyasu, A., Nakayama, H. y Ohizumi, Y. (1998) Dual regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor by triadin and calsequestrin. *Biochemistry* **37**: 12987-12993.
  152. Ohnishi, M. y Reithmeier, R. A. F. (1987) Fragmentation of rabbit skeletal muscle calsequestrin: spectral and ion binding properties of the carboxyl-terminal region. *Biochemistry* **26**: 7458-7465.
  153. Ostwald, T. J. y MacLennan, D. H. (1974a) Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **249**: 974-979.
  154. Ostwald, T. J. y MacLennan, D. H. (1974b) Effects of cation binding on the conformation of calsequestrin and the high affinity calcium-binding protein of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **249**: 5867-5871.
  155. Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. K., Zorzato, F., Green, N. M. y MacLennan, D. H. (1990) Molecular cloning of cDNA encoding the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **265**: 13472-13483.
  156. Ottini, L., Marziali, G., Conti, A., Chalesworth, A. y Sorrentino, V. (1996)  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of ryanodine receptor from chicken skeletal muscle are the homologues of mammalian RyR1 and RyR3. *Biochem. J.* **315**: 207-216.
  157. Oyamada, H., Murayama, T., Takagi, T., Iino, M., Iwabe, N., Miyata, T., Ogawa, Y. y Endo, M. (1994) Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **269**: 17206-17214.
  158. Pessah, I. N., Anderson, K. W. y Casida, J. E. (1986a) Solubilization and separation of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from the  $\text{Ca}^{2+}$ -ryanodine receptor complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**: 235-243.
  159. Pessah, I. N., Francini, A. O., Scales, D. J., Water-House, A. L. y Casida, J. E. (1986b) Calcium-ryanodine receptor complex. Solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* **261**: 8643-8648.
  160. Ríos, E., Ma, J. y Gonzalez, A. (1991) The mechanical hypothesis of excitation-contraction (EC) coupling in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **12**: 127-135.

161. Ríos, E. y Pizarro, G. (1991) Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* **71**: 849-908.
162. Ríos, E., Pizarro, G. y Stefani, E. (1992) Charge movement and the nature of the signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 109-133.
163. Ríos, E. y Stern, M. D. (1997) Calcium in close quarters. Microdomain feedback in excitation-contraction coupling and other cell biological phenomena. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**: 47-82.
164. Rousseau, E., LaDine, J., Liu, Q. y Meissner, G. (1988) Activation of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* **267**: 75-86.
165. Rousseau, E., Smith, J. S. y Meissner, G. (1987) Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *Am. J. Physiol.* **253**: C364-C368.
166. Saiki, Y., El-Hayek, R. e Ikemoto, N. (1999) Involvement of the Glu<sup>724</sup>-Pro<sup>760</sup> region of the dihydropyridine receptor II-III loop in skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *J. Biol. Chem.* **274**: 7825-7832.
167. Salama, G., Abramson, J. J. y Pike, G. K. (1992) Sulfhydryl reagents trigger  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum of skinned rabbit psoas fibres. *J. Physiol.* **454**: 389-420.
168. Sarkösi, S., Pouliquin, P. y Herrmann-Frank, A (1998) Regulation of the mutant ryanodine receptor from malignant hyperthermia-susceptible muscle by calcium and 4-chloro-m-cresol. *Pflügers Arch.* **435**: R177.
169. Schneider, M. F. y Chandler, W. K. (1973) Voltage dependent charge movement in skeletal muscle. *Nature* **242**: 244-246.
170. Sen, C. K. (1995) Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* **79**: 675-686.
171. Shirokova, N. y Ríos, E. (1996a) Activation of  $\text{Ca}^{2+}$  release by caffeine and voltage in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* **493**: 317-339.
172. Shirokova, N. y Ríos, E. (1996b) Caffeine enhances intramembranous charge movement in frog skeletal muscle by increasing cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *J. Physiol.* **493**: 341-356.

173. Shomer, N. H., Louis, C. F., Fill, M., Litterer, L. A. y Mickelson, J. R. (1993) Reconstitution of abnormalities in the malignant hyperthermia-susceptible pig ryanodine receptor. *Am. J. Physiol.* **264**: C125-C135.
174. Slavik, K. J., Wang, J.-P., Aghdasi, B., Zhang, J.-Z., Mandel, F., Malouf, N. y Hamilton, S. L. (1997) A carboxy-terminal peptide of the  $\alpha_1$ -subunit of the dihydropyridine receptor inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **272**: C1475-C1481.
175. Smith, J. S., Coronado, R. y Meissner, G. (1986) Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: activation by  $\text{Ca}^{2+}$  and ATP and modulation by  $\text{Mg}^{2+}$ . *J. Gen. Physiol.* **88**: 573-588.
176. Smith, J. S., Imagawa, T., Ma, J., Fill, M., Campbell, K. P. y Coronado, R. (1988) Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* **92**: 1-26.
177. Smith, J. S., Rousseau, E. y Meissner, G. (1989) Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circ. Res.* **64**: 352-359.
178. Stange, M., Tripathy, A. y Meissner, G. (2001) Two domains in dihydropyridine receptor activate the skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *Biophys. J.* **81**: 1419-1429.
179. Stricker, S. A., Centonze, V. E., Paddock, S. W. y Schatten, G. (1992) Confocal microscopy of fertilization-induced calcium dynamics in sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **149**: 370-380.
180. Stuart, J., Pessah, I. N., Favero, T. G. y Abramson, J. J. (1992) Photooxidation of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum induces rapid calcium release. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**: 512-521.
181. Suárez-Isla, B. A., Irribarra, V., Oberhauser, A., Larralde, L., Bull, R., Hidalgo, C. y Jaimovich, E. (1988) Inositol (1,4,5)-trisphosphate activates a calcium channel in isolated sarcoplasmic reticulum membranes. *Biophys. J.* **54**: 737-741.
182. Suda, N. (1995) Involvement of dihydropyridine receptors in terminating  $\text{Ca}^{2+}$  release in rat skeletal myotubes. *J. Physiol. (London)* **486**: 105-112.
183. Suko, J. y Hellman (1998) Modification of sulfhydryls of the skeletal muscle calcium release channel by organic mercurial compounds alters  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of regulatory  $\text{Ca}^{2+}$  sites in single channel recordings and [ $^3\text{H}$ ]ryanodine binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**: 435-450.

184. Sumbilla, C. e Inesi, G. (1987) Rapid filtration measurements of  $\text{Ca}^{2+}$  release from cisternal sarcoplasmic reticulum vesicles. *FEBS Lett.* **210**: 31-36.
185. Sun, J., Xu, L., Eu, J. P., Stamler, J. S. y Meissner, G. (2001) Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J. Biol. Chem.* **276**: 15625-15630.
186. Sutko, J. y Airey, J. (1996) Ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  release channels: Does diversity in form equal diversity in function? *Physiol. Rev.* **76**: 1027-1071.
187. Szegedi, C., Sárközi, S., Jóna, I. y Varsányi, M. (1999) Calsequestrin: more than 'only' a luminal  $\text{Ca}^{2+}$  buffer inside the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **337**: 19-22.
188. Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T. y Numa, S. (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature (London)* **339**: 439-445, 1989.
189. Tanabe, T., Beam, K. G., Adams, B. A., Niidome, T. y Numa, S. (1990) Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature (London)* **346**: 567-569.
190. Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockenzi, V., Takahashi, H., Kankawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Horose, T. y Numa, S. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature (London)* **328**: 313-318.
191. Tanaka, M., Ozawa, T., Maurer, A., Cortese, J. D., y Fleischer, S. (1986) Apparent cooperativity of  $\text{Ca}^{2+}$  binding associated with crystallization of  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein from sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 369-378.
192. Timerman, A. P., Ogunbunmi, E., Freund, E., Wiederrecht, G., Marks, A. R. y Fleischer, S. (1993) The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein: dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**: 22992-22999.
193. Trimm, J., Salama, G. y Abramson, J. J. (1986) Sulfhydryl oxidation induces rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* **261**: 16092-16098.
194. Tripathy, A. y Meissner, G. (1996) Sarcoplasmic reticulum luminal  $\text{Ca}^{2+}$  has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *Biophys. J.* **70**: 2600-2615.

195. Tripathy, A., Xu, L., Mann, G. y Meissner, G. (1995) Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) *Biophys. J.* **69**: 106-119.
196. Volpe, P. y Simon, B. (1991) The bulk of  $\text{Ca}^{2+}$  released to the myoplasm is free in the sarcoplasmic reticulum and does not unbind from calsequestrin. *FEBS Letter.* **278**: 274-278.
197. Wang, S., Trumble, W. R., Liao, H., Wesson, C. R., Dunker, A. K. y Kang, C. (1998) Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature Structural Biology* **5**: 476-483.
198. Wayne Chen, S. R., Ebisawa, K., Li, X. y Zhang, L. (1998) Molecular identification of the ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  sensor. *J. Biol. Chem.* **273**: 14675-14678.
199. Westerblad, H. y Allen, D. G. (1992) Myoplasmic free  $\text{Mg}^{2+}$  concentration during repetitive stimulation of single fibers from mouse skeletal muscle. *J. Physiol.* **453**: 413-434.
200. Whitaker, M. y Patel, R. (1990) Calcium and cell cycle control. *Development* **180**: 525-542.
201. Wyskovsky, W. (1994) Caffeine-induced calcium oscillations in heavy-sarcoplasmic-reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **221**: 317-325.
202. Xia, R., Stangler, T. y Abramson, J. J. (2000) Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators. *J. Biol. Chem.* **275**: 36556-36561.
203. Yano, K. y Zarain-Herzberg, A. (1994) Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. *Mol. Cell Biochem.* **135**: 61-70.
204. Zable, A. C., Favero, T. G. y Abramson, J. J. (1997) Glutathione modulates ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for redox regulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanism. *J. Biol. Chem.* **272**: 7069-7077.
205. Zaidi, N. F., Lagenaur, C. F., Abramson, J. J., Pessah, I. y Salama, G. (1989) Reactive disulfides trigger  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum via an oxidation reaction. *J. Biol. Chem.* **264**: 21725-21736.
206. Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M. y Jones, L. R. (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **272**: 23389-23397.

207. Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., Phillips, M., Green, N. M., Lai, F. A., Meissner, G. y MacLennan, D. H. (1990) Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **265**: 2244-2256.
208. Zucchi, R. y Ronca-Testoni, S. (1997) The sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  channel/ryanodine receptor: Modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharm. Rev.* **49**: 1-51.